

**UNTERSUCHUNGEN
ZUM WIRKUNGSMECHANISMUS VON
POLYANIONEN IN VIVO**

Fritz Rupert Ungemach

1975

Aus dem Institut für Pharmakologie, Toxikologie und Pharmazie
des Fachbereichs Tiermedizin
der Universität München

Vorstand: Prof. Dr. D. Hegner

Arbeit angefertigt unter der Leitung von
Prof. Dr. K. Tempel

UNTERSUCHUNGEN ZUM WIRKUNGSMECHANISMUS VON
POLYANIONEN IN VIVO

Inaugural - Dissertation
zur Erlangung der tiermedizinischen Doktorwürde
des Fachbereichs Tiermedizin
der Ludwig-Maximilians-Universität München

von
Fritz Rupert Ungemach
aus München

München 1975

Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs
Tiermedizin der Universität München

Dekan: Prof. Dr. B. Vollmerhaus

Referent: Prof. Dr. K. Tempel

Korreferent: Prof. Dr. D. Giesecke

Tag der Promotion: 18. Juli 1975



INHALTSVERZEICHNIS

	Seite
1. PROBLEMSTELLUNG	1
2. EINLEITUNG	2
2.1. Chemische Struktur von Polyanionen	2
2.1.1. Nukleotidfreie Polyanionen	3
2.1.2. Nukleotidhaltige Polyanionen	8
2.2. Struktur-Wirkungsbeziehungen	13
2.3. Wechselwirkung von Polyanionen mit biologischen Systemen	17
2.3.1. Zellfreie Systeme und subzelluläre Einheiten	17
2.3.1.1. Zellkerne und DNA-Stoffwechsel	17
2.3.1.2. RNA- und Proteinstoffwechsel	21
2.3.1.3. Zellatmung	23
2.3.1.4. Enzyme	23
2.3.2. Isolierte Zellen und Zellkulturen	24
2.3.2.1. Zelluläre Aufnahme	24
2.3.2.2. Zellteilung	26
2.3.2.3. Virostatische Wirkung	29
2.3.3. Organismen	32
2.3.3.1. Pharmakokinetik	32
2.3.3.2. Toxizität	34
2.3.3.3. Systemwirkungen	36
2.3.3.3.1. Blut	36
2.3.3.3.2. Enzyme	39
2.3.3.3.3. Hormone	40
2.3.3.3.4. Immunsystem	40
2.3.3.3.5. Tumorstadium	44
2.3.3.3.6. Strahlenschutz	50
3. MATERIAL UND METHODIK	52
3.1. Reagentien und Tiermaterial	52
3.1.1. Reagentien	52
3.1.2. Tiermaterial	55
3.1.3. Haltung und Fütterung der Versuchstiere	55

	Seite
3.1.4.	Behandlung der Tiere 55
3.1.4.1.	Lösungen 55
3.1.4.2.	Bestimmung der Reaktionsmaxima 56
3.1.4.3.	Bestimmung der Anilinhydroxylase- und DNase II-Aktivität 57
3.1.4.4.	Bestimmung des Einbaus von Thymin-2- ¹⁴ C in die DNA und von Phenylalanin-U- ¹⁴ C in Protein 57
3.1.5.	Aufarbeitung der Tiere 57
3.1.6.	Behandlung der Proben 58
3.1.6.1.	Bestimmung des relativen Frischge- wichts der Organe 58
3.1.6.2.	Homogenisation der Organe 58
3.2.	Bestimmung der Nukleinsäuren- und DNA-Konzentration 59
3.2.1.	Prinzip 59
3.2.2.	Lösungen 61
3.2.3.	Ausführung 62
3.2.4.	Berechnung 62
3.3.	Bestimmung der RNA-Konzentration 63
3.3.1.	Prinzip 63
3.3.2.	Lösungen 64
3.3.3.	Ausführung 64
3.3.4.	Berechnung 64
3.4.	Bestimmung der Proteinkonzentration 65
3.4.1.	Prinzip 65
3.4.2.	Lösungen 66
3.4.3.	Ausführung 66
3.4.4.	Berechnung 66
3.5.	Bestimmung der Anilinhydroxylase- Aktivität 67
3.5.1.	Prinzip 67
3.5.2.	Lösungen 68
3.5.3.	Mikrosomenpräparation 69
3.5.3.1.	Prinzip 69
3.5.3.2.	Lösungen 69
3.5.3.3.	Ausführung 69

	Seite
3.5.4.	Ausführung der AH-Aktivitäts-Bestimmung 70
3.5.5.	Berechnung 71
3.6.	Bestimmung der DNase II-Aktivität 72
3.6.1.	Prinzip 72
3.6.2.	Lösungen 73
3.6.3.	Ausführung 73
3.6.4.	Berechnung 73
3.7.	Messung des Einbaus von Thymidin-2- ¹⁴ C in die DNA 74
3.7.1.	Prinzip 74
3.7.2.	Lösungen 75
3.7.3.	Ausführung 75
3.7.4.	Berechnung 76
3.8.	Messung des Einbaus von Phenylalanin-U- ¹⁴ C in Protein des mikrosomalen (12 500 x g-) Überstands 77
3.8.1.	Prinzip 77
3.8.2.	Lösungen 78
3.8.3.	Ausführung 78
3.8.4.	Berechnung 78
3.9.	Isolierung von Hepatozyten und Messung des Einbaus von Thymidin-2- ¹⁴ C in die DNA von Leberzellen 79
3.9.1.	Prinzip 79
3.9.2.	Lösungen 80
3.9.3.	Ausführung 80
3.9.4.	Berechnung 83
3.10.	Fehlerberechnung und Signifikanzanalyse 83
3.10.1.	Fehlerberechnung 83
3.10.2.	Signifikanzanalyse 84
3.11.	Meßgrößen und Einheiten 85
4.	ERGEBNISSE 86
4.1.	Kontrollwerte 86
4.2.	Ergebnisse zur Methodik 87
4.2.1.	DNA-Abbau an DNase II aus Leber und Milz: Inkubationsdauer und Enzymkonzentration 87

	Seite
4.2.2.	Mikrosomenpräparation:
	Unterschiede zwischen den einzelnen Präparationsschritten
	89
4.2.2.1.	Protein
	89
4.2.2.2.	Einbau von Phenylalanin-U- ^{14}C
	89
4.2.2.3.	Anilinhydroxylase
	93
4.2.3.	Einbau von Thymidin-2- ^{14}C
	94
4.2.3.1.	Isolierung ^{14}C -markierter DNA:
	Verhalten von DNA-Konzentration und Impulsrate während der einzelnen Präparationsschritte
	94
4.2.3.2.	Markierungsdauer und Tracerdosıs
	96
4.2.4.	Hepatozytenisolierung
	98
4.2.4.1.	Morphologie und Vitalität
	98
4.2.4.2.	Hepatozytenausbeute in Abhängigkeit von Inkubationsdauer und Zentrifugation
	99
4.2.4.3.	DNase II- Aktivität
	102
4.2.4.4.	Einbau von Thymidin-2- ^{14}C in die DNA von Hepatozytensuspension und Zentri- fugationsüberständen
	103
4.2.5.	Tiermaterial
	104
4.3.	Ergebnisse zum Wirkungsmechanismus von Polyanionen
	107
4.3.1.	Gewicht, DNA-, RNA- und Proteingehalt von Leber, Milz und Thymus unter dem Einfluß von Polyanionen
	107
4.3.1.1.	PVS
	107
4.3.1.2.	DNA
	112
4.3.1.3.	Poly(rI)· Poly(rC)
	116
4.3.2.	Untersuchungen am Reaktionsmaximum
	120
4.3.2.1.	PVS
	121
4.3.2.1.1.	Reaktionsmaximum
	121
4.3.2.1.2.	DNase II-Aktivität
	122
4.3.2.1.3.	Anilinhydroxylase-Aktivität
	125
4.3.2.1.4.	Phenylalanin-U- ^{14}C -Einbau
	126
4.3.2.1.5.	Thymidin-2- ^{14}C -Einbau
	127
4.3.2.1.6.	Thymidin-2- ^{14}C -Einbau in die DNA von Hepatozyten und Zentrifugations- überständen
	128

	Seite
4.3.2.2. DNA	130
4.3.2.2.1. Reaktionsmaximum	130
4.3.2.2.2. DNase II-Aktivität	131
4.3.2.2.3. Anilinhydroxylase-Aktivität	133
4.3.2.2.4. Phenylalanin-U- ¹⁴ C-Einbau	134
4.3.2.2.5. Thymidin-2- ¹⁴ C-Einbau	135
4.3.2.2.6. Thymidin-2- ¹⁴ C-Einbau in die DNA von Hepatozyten und Zentrifugations- überständen	136
4.3.2.3. Poly(rI)·Poly(rC)	138
4.3.2.3.1. Reaktionsmaximum	138
4.3.2.3.2. DNase II-Aktivität	139
4.3.2.3.3. Anilinhydroxylase-Aktivität	141
4.3.2.3.4. Einbau von Phenylalanin-U- ¹⁴ C	142
4.3.2.3.5. Thymidin-2- ¹⁴ C-Einbau	143
4.3.2.3.6. Thymidin-2- ¹⁴ C-Einbau in die DNA von Hepatozyten und Zentrifugations- überständen	144
4.3.2.4. Ergebnisse an den Reaktionsmaxima	146
5. DISKUSSION	148
5.1. PVS	148
5.2. DNA	151
5.3. Poly(rI)·Poly(rC)	153
6. ZUSAMMENFASSUNG	157
SUMMARY	159
7. LITERATURVERZEICHNIS	161

Lebenslauf

1. PROBLEMSTELLUNG

Reaktionen, an denen Nukleinsäuren unmittelbar beteiligt sind, lassen sich *in vitro* durch Polyanionen anderer Art beeinflussen. Soweit es sich dabei um Vorgänge der Replikation und Transkription handelt, wird eine physiologische Funktion von Polyanionen bei der Regulation der Genaktivität diskutiert (63, 120, 163).

Einige dieser *in vitro* erhobenen Befunde lassen sich auch unter *In vivo*-Bedingungen nachweisen. Von besonderer praktischer Bedeutung sind die antimitotische Wirkung verschiedener anionischer Makromoleküle (103, 110, 111, 134, 145 u.a.) sowie die Erhöhung der humoralen und zellulären Abwehr (39, 46 - 51, 56, 91, 110 u.a.). In Organen mit hohen RES-Anteilen (Leber, Milz) lassen sich im allgemeinen proliferative (171, 186), in Thymus und Lymphknoten (je nach Versuchsbedingungen) hyper- oder hypoplastische Reaktionen nachweisen (31, 46).

Als experimenteller Beitrag zur Klärung des Wirkungsmechanismus anionischer Makromoleküle *in vivo* wurde vorliegend der Einfluß von 3 verschiedenen Polyanionen - Typ I: Polyvinylsulfat, Typ II: Nativ-DNA, Typ III: Poly(rI)·Poly(rC) - auf DNA-, RNA- und Proteingehalt von Leber, Milz und Thymus der Maus sowie die Beeinflussung der Makromolekülsynthese in der Leber unter gesonderter Berücksichtigung von RES- und Parenchymanteilen untersucht. Als Leitenzyme der untersuchten Gewebsanteile dienten die Desoxyribonuklease II (DNase II) aus Milz und Leber sowie die Anilinhydroxylase der Leber.

2. EINLEITUNG

2.1. Chemische Struktur von Polyanionen

Polyanionen sind natürliche, halbsynthetische oder synthetische makromolekulare, negativ geladene Polyelektrolyte mit regelmäßig sich wiederholenden polaren Gruppen.

Da Polyanionen Polymere aus vielen unterschiedlichen Grundbausteinen sind, werden sie chemisch am einfachsten nach ihren anionischen Gruppen eingeteilt:

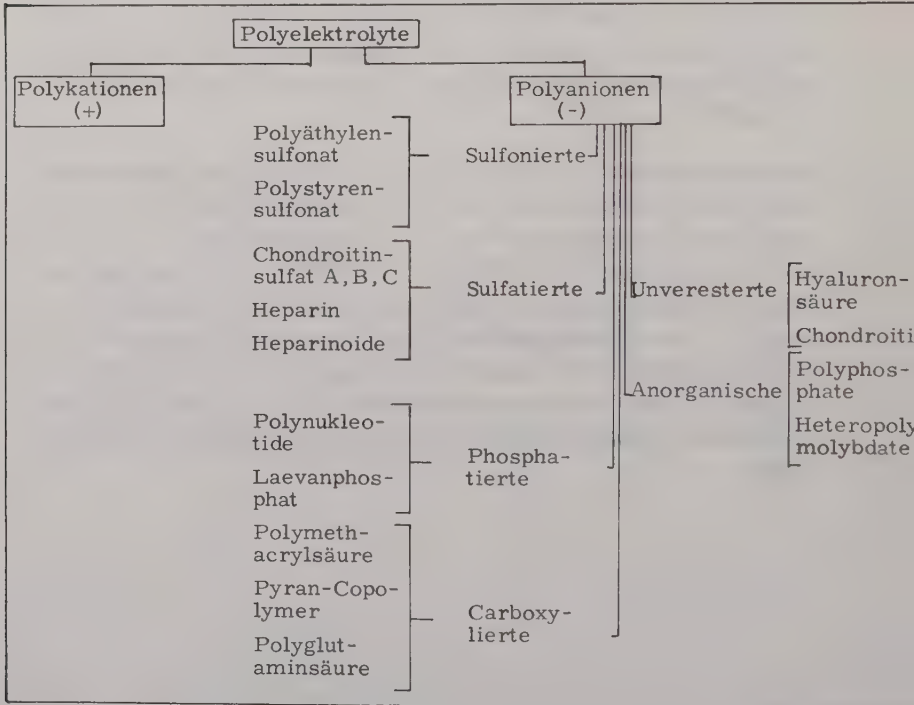


Abb. 1: Chemische Klassifizierung von Polyanionen mit Beispielen (modifiziert nach 12).

Unter Berücksichtigung der Beeinflussung von Nukleinsäureabhängigen Prozessen erfolgt vorliegend eine Einteilung in nukleotidfreie und nukleotidhaltige Polyanionen.

2.1.1. Nukleotidfreie Polyanionen

Die meisten nukleotidfreien Polyanionen organischer Herkunft sind Polysaccharide, welche jedoch nur teilweise von Natur aus eine polyanionische Struktur besitzen.

Zu den natürlichen Polyanionen zählen die ubiquitär im Organismus, hauptsächlich als Gerüst- und Schleimsubstanzen, verbreiteten Heteroglykane oder Mukopolysaccharide. Ihr Grundgerüst besteht aus in 1-4-Stellung zu einem linearen Makromolekül verknüpften Disaccharideinheiten, in denen eine Uronsäure (D-Glukuronsäure, seltener L-Iduronsäure) an C 3 eines acetylierten Aminosuckers gebunden ist. Ein Teil dieser Heteroglykane ist noch mit Schwefelsäure verestert, so daß die anionischen Gruppen dieser stark sauren Stoffe aus Carboxylresten der Uronsäuren und/oder Schwefelsäureresten bestehen.

Das am einfachsten gebaute Heteroglykan ist die Hyaluronsäure. Sie besteht aus Glukuronsäure und N-Acetylglukosamin und hat ein Molekulargewicht (MG) von mehreren Millionen. Die anionischen Gruppen werden durch Carboxylreste gebildet.

Von den Chondroitinschwefelsäuren sind drei Typen, A, B und C, bekannt. Typ A und B besteht aus Glukuronsäure, Typ C aus L-Iduronsäure und N-Acetylgalaktosamin, an das die Schwefelsäure in 4- bzw. bei Typ B (Dermatansulfat) in 6-Stellung gebunden ist (96).

Die bekannteste Mukoitinschwefelsäure ist das in hoher Konzentration in den Ehrlich-Mastzellen enthaltene Heparin, die stärkste organische Säure des Säugetierorganismus, ein Polymer aus Tetrasacchariduntereinheiten mit einem MG von 17 000 bis 20 000. Jede dieser Untereinheiten (Aminosucker und Glukuronsäure in 1 → 4 — 1 → 4-Bindung) ist mit 4 bis 5 Molekülen Schwefelsäure entweder über

die Aminogruppe des Aminosuckers oder über C 3 und/oder C 6 der Glukuronsäure verestert, so daß einzelne Disaccharideinheiten als Mono-, Di- und Trischwefelsäureester vorliegen können (96, 104, 130). Nicht konstanter Schwefelgehalt der einzelnen Untereinheiten und verschiedener Polymerisationsgrad bedingen erhebliche art- und organspezifische Unterschiede in der gerinnungshemmenden Wirkung. So besitzt Heparin aus Hundelunge eine 4fach höhere Aktivität als jenes aus Schweinelunge.

Elektrophoretisch kann Heparin in 2 Fraktionen zerlegt werden, in das gerinnungshemmende α -Heparin aus d-Glukosamin und Glukuronsäure und das unwirksame β -Heparin, das d-Galaktosamin anstelle von d-Glukosamin enthält. Das in Handelspräparaten allgemein als Na-Salz vorliegende Heparin wird durch Extraktion aus tierischen Geweben (z. B. aus Ochsenmuskel) gewonnen und ist unter verschiedenen Handelsnamen erhältlich (Heparin-Novo [®], Hepathrom [®], Thrombophob [®] u. a.) (130).

Bakterien besitzen Heteroglykane in Zellwand und Kapsel. Die sog. "Mureine" sind Zellwandstrukturen, die sich vorwiegend aus Muraminsäure (die über ihre Carboxylgruppen mit Aminosäuren zu Muropeptiden verbunden ist) und Teichoinsäuren (die als polymere Phosphorsäureester vorliegen) zusammensetzen (96). Bakterienkapseln enthalten Lipopolysaccharide mit Phosphorsäureresten und Seitenketten aus Oligosacchariden, von deren Sequenz die Antigenität (O-Antigen) dieser "Endotoxine" abhängig ist (64, 96).

Ein weiteres natürliches Polyanion ist das bei Viruserkrankungen zur Interferoninduktion eingesetzte Statolon. Es handelt sich dabei um ein komplexes anionisches Polysaccharid, das sich nach Fermentation im Filtrat von *Pen. stoloniferum* befindet (39).

Heparinoide sind saure, überwiegend sulfatierte Polymere. Sie imitieren die Heparinwirkung, haben jedoch aufgrund ihrer geringen therapeutischen Breite nur wenig Eingang in die Klinik gefunden (45, 64, 79, 104, 130):

Die Gruppe der halbsynthetischen Heparinoide besteht aus

tierischen und pflanzlichen Polysacchariden, die enzymatisch oder durch Säurehydrolyse zu Molekülen bestimmter Größe abgebaut und anschließend sulfatiert wurden. Unverzweigte Polysaccharide, wie Cellulose, Chitin, Chondroitin, Dextran, sind als Schwefelsäureester gerinnungsaktiv, während verzweigte, wie Stärke, trotz polyanionischer Struktur, keine heparinähnliche Wirkung besitzen (130).

Die vollsynthetischen Heparinoide sind zuckerunähnliche, vorwiegend Sulfogruppen enthaltende Polymere aus organischen Bausteinen, z. B. aus Äthylen, Anethol, Vinylalkohol u.a., die, wie im Falle des Polyvinylsulfats (PVS), bis zu 25 % der Heparinwirkung erreichen können (130). Abb. 2 zeigt einen Formelausschnitt aus der Strukturformel des PVS. Die Substanz ist ein Polymer aus Polyvinylalkohol (MG 5000 bis 8000), bei dem mehr als 98 % der freien OH-Gruppen mit Schwefelsäure verestert sind (186).

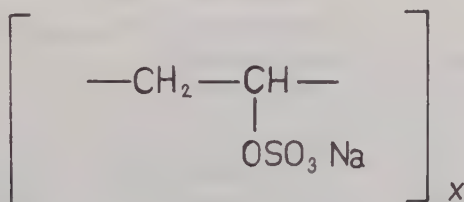


Abb. 2: Formelausschnitt aus der Strukturformel des Polyvinylsulfats als Na-Salz.

Entsprechend dem Heparin sind auch bei den Heparinoiden gerinnungshemmende und andere biologische Wirkungen - v.a. auf verschiedene Enzymsysteme - vom Schwefelgehalt (optimal zwischen 12 und 17 %) und vom Polymerisationsgrad (z. B. ist Dextransulfat erst ab MG 7000 wirksam) abhängig (68, 89, 120, 130).

Abgesehen von einigen phosphorylierten polymeren Zuckern (z. B. Laevanphosphat) besitzen carboxylierte und phosphorylierte Polyanionen keine oder nur geringfügige gerinnungshemmende Wirkung (130) bei im übrigen gleichem, von der polyanionischen

Struktur abhängigen, biologischen Wirkungsspektrum.

Tab. 1: Einige der gebräuchlichsten halb- und vollsynthetischen Heparinoide mit Handelsnamen und chemischer Zusammensetzung (45, 130).

Präparatname [®]	chem. Zusammensetzung	Bausteine
Thrombocid	Xylanpolyschwefelsäure- ester	Xylose
Dexulate	Dextransulfat	Glukose
Hemeran	sulfat. Polygalakturon- säure (methylester-	Galakturonsäure
Treburon	methylester- methyl-glykosid)	
Thrombostop	(Mepessulfate)	
Paritol	Polymannuronsäure- sulfat (Schwefelsäure- ester aus Alginaten)	Mannuronsäure
Ro 1-8307	N-formyl-chitosanpoly- schwefelsäureester	Glukosamin
Kysat	Chitinsulfat	
Eleparon	Mukopolysaccharidpoly- schwefelsäureester	Uronsäuren u. Aminozucker
SP ₅₄	Pentosanpolyschwefel- saures Natrium	Xylopyranose
Pergalen "Natriumapolat"	Polyäthylensulfonat	Äthylensulfon- saures Natrium
Liquoid	Polyanetholsulfat	Anethol
	Polyvinylsulfat (PVS)	Vinylacetat(-alkohol)

Zur Gruppe der phosphorylierten Polyanionen gehören beispielsweise Poly-p,p-dihydroxy-dibenzylphosphat, Poly-p,p-dihydroxy-diphenylmetaphosphat, Polyphloretinphosphat, Polyxenylphosphat (159).

Carboxylierte Polyanionen sind z. B. Polymethacrylsäure (136), Pyran-Copolymer (ein Copolymeres aus Maleinsäureanhydrid und Divinyläther, MG 17 000 - 45 000) (39), Poly-L-aspartat, Poly-L-glutamat, Polyglukose-carboxylat und L-Tyrosin-L-Glutaminsäure-Copolymeres (159).

Die physikalischen Eigenschaften einiger anorganischer Stoffe erlauben die Bildung von Polyanionen aus anorganischen Bausteinen:

Biologische Bedeutung besitzen die Polyphosphate, Polymere der Metaphosphorsäure mit einem MG bis zu mehreren Millionen (p. 269 in 82). Polyphosphate können von Bakterien, Hefen und Pilzen synthetisiert werden. In synchronisierten Bakterienkulturen häufen sie sich zu Beginn der logarithmischen Wachstumsphase an und sind v. a. zum Ende der Wachstumsphase als schneckenförmige, metachromatische Granula (vermutliche "Energielager") nachweisbar. Polyphosphate kommen wahrscheinlich auch in höheren Organismen vor, ihre biologische Bedeutung ist jedoch bislang unbekannt (120, 145).

Sulfate und Metasilikate zeigen die gleiche Polymerisationsneigung wie Phosphate, so ist z. B. Bentonit ein polymeres Mg-Al-silikat mit unbegrenzter Anionengröße (pp. 270 und 330 in 82).

Schwache, mehrbasige, sauerstoffhaltige, polymerisierte Metallsäuren (Isopolysäuren), z. B. von Wolfram oder Molybdän, können mit schwachen bis mittelstarken Nichtmetallsäuren (wie Bor-, Kiesel-, Phosphorsäure u. a.) Heteropolysäuren (wie Heteropolymolybdate - Phosphormolybdat - oder -wolframate - Silicowolframat -) bilden (p. 531 in 82), die aufgrund ihrer polyanionischen Struktur ähnliche biologische Wirkungen wie das Heparin haben (145, 159).

2.1.2. Nukleotidhaltige Polyanionen

Die in dieser Gruppe zusammengefaßten Polyanionen besitzen alle ein gemeinsames Grundbauprinzip:

In Polynukleotiden sind Nukleoside über ihre Aldopentosen durch 3'-5'-Phosphodiesterbindungen zu polymeren Strängen verknüpft (p. 39 ff. in 20, p. 105 ff. in 96).

Strukturell unterscheiden sich natürlich vorkommende oder synthetisch hergestellte Polynukleotide

1. in der Zuckerkomponente der Nukleoside:

Dadurch wird eine Einteilung in Ribonukleinsäuren (RNA, Ribose-haltig) und Desoxyribonukleinsäuren (DNA, Desoxyribose-haltig) bedingt.

2. in ihrer Primärstruktur:

Heterologe Nukleinsäuren differieren hinsichtlich Basenzusammensetzung und Basensequenz, woraus sich Veränderungen in den Codierungseigenschaften ergeben.

3. in der Sekundärstruktur:

Einzelstränge von Nukleinsäuren besitzen immer helikale Struktur. Doppelsträngige Nukleinsäuren können entweder als Hybride verschiedener Polynukleotide oder als Doppelhelix aus basenkomplementären Strängen vorliegen. Die von der Sekundärstruktur abhängigen, funktionellen Unterschiede resultieren u. a. aus verschiedenen starker Widerstandsfähigkeit gegenüber Nukleasen (Doppelhelix < Hybride < Einzelstränge) (39).

4. in der Tertiärstruktur:

Die Unterschiede sind von geringer funktioneller Bedeutung und betreffen nur doppelsträngige Nukleinsäuren, die als monomere oder dimere Ringe, "Supercoils" oder Catenane vorliegen können, und die tRNA, die eine ausgeprägte Schleifenstruktur aufweist (p. 45 in 20).

Natürlich vorkommende Nukleinsäuren:

Desoxyribonukleinsäuren:

Desoxyribonukleinsäure ("Thymonukleinsäure") besitzt als charakteristische Bausteine die Base Thymin und die 2'-Desoxyribose. Sie besteht, außer bei einigen einsträngigen Bakteriophagen und Viren, aus 2 zu einer Doppelhelix organisierten Strängen, die die o.e. Tertiärstrukturen bilden können.

Tab. 2: Molekulargewichte einiger Desoxyribonukleinsäuren

DNA	MG	Nukleotide/Molekül
Gesamt-DNA (Säuger)	1×10^7	15 000 Paare
E. coli	1×10^9	2×10^6 Paare
T-Phagen (doppelsträngig)	$1,2 \times 10^8$	2×10^5 Paare
Φ X-Phage (einsträngig)	$1,7 \times 10^6$	5 000

(p. 40 in 20).

Bei Eukaryonten ist die DNA zu 95 % im Zellkern als Desoxyribonukleoproteid lokalisiert, das entsprechend seinen funktionellen Eigenschaften in Eu- oder Heterochromatin differenziert ist. 1 - 10 % (tierartlich unterschiedlich) der Kern-DNA befinden sich als sog. "Satelliten-DNA" an den Nukleolus assoziiert. Geringe DNA-Mengen kommen in den Mitochondrien, Kinetoplasten und in der Mikrosomenmembran vor.

Bei Prokaryonten ist der Hauptanteil der DNA auf die Kernäquivalente ("Bakterienchromosom") beschränkt. "Extrachromosomale", DNA-haltige Komponenten sind die Plasmiden und Episomen (p. 56 in 20).

Ribonukleinsäuren:

RNA ("Hefenukleinsäure") ist gekennzeichnet durch Uracil und Ribose und besteht in der Regel aus einer einsträngigen, helikalen Polynukleotidkette (Ausnahmen: doppelsträngige RNA von Diplorna-Viren und replikative Formen einsträngiger, viraler RNAs). Bei der tRNA ist die Tertiärstruktur in Form eines dreidimensional gefalteten Kleeblatts deutlich ausgeprägt, in dem sich, wie z. B. auch im einsträngigen Molekül der rRNA, nur einzelne, doppelhelikal organisierte Abschnitte befinden (p. 44 ff. in 20).

Bei Eukaryonten (z. B. in Leberzellen) finden sich 70 bis 90 % der RNA im Zytoplasma und 10 bis 30 % im Kern.

Verteilung im Kern:

50 % chromosomale RNA (10 - 90 S- und 4 - 7 S-Fraktionen)
50 % Nukleolus-RNA (rRNA mit 45, 35, 29 und 18 S-Fraktionen)

Zytoplasma:

70 - 80 % rRNA in den Ribosomen mit 28 und 18 S-Fraktionen
10 - 20 % tRNA im Zytosol
3 - 10 % mRNA in den Mikrosomen- und Polysomenfraktionen
5 - 15 % RNA in den Mitochondrien

Bei Prokaryonten, wie *E. coli*, beträgt das Mengenverhältnis von rRNA/tRNA/mRNA etwa 50/10/1. Die tRNA ist nicht strukturgebunden, rRNA (23, 16, 5 S) ist in Ribosomen mit Proteinen, mRNA in Polysomen organisiert (p. 59 in 20).

Tab. 3: Molekulargewichte einiger Ribonukleinsäuren

RNA	MG	Nukleotide/Molekül
tRNA	$2,5-3 \times 10^4$	75 - 85
5 S-RNA (E. coli)	$5,1 \times 10^4$	120
rRNA (E. coli)	$0,6 \times 10^6$	1800
	$1,2 \times 10^6$	3500
rRNA (Hefe)	$0,65 \times 10^6$	1900
	$1,2 \times 10^6$	3500
Tabakmosaikvirus	2×10^6	5900
Reo-Virus (doppelsträngig)	8×10^6	11 500 Paare
Phage M 12	1×10^6	3000

(p. 40 in 20)

Durch Veränderungen in der Primär- und Sekundärstruktur können "halbsynthetische" Polynukleotide aus den natürlich vorkommenden Nukleinsäuren gebildet werden:

Behandlung von Nukleinsäuren mit mutagenen Substanzen (z. B. Alkylantien, Hypoxanthin, salpetrige Säure) führt zu Veränderungen in der Basenkonfiguration und dadurch in den Codierungseigenschaften mit teilweiser Hemmung der Replikation oder "Basenverwechslungen" (p. 110 in 96, 126). Auf der Stufe der Polynukleotidkette entstehen so unter Mitwirkung spezifischer Enzyme durch Einführung von Methyl-, Isopentenyl-, Thio- und Acetylgruppen in das Basenmolekül seltene Basen, von denen bisher ca. 30 isoliert werden konnten: Wie mono- und dimethylierte Basen, Isopentenylpurine, Thiopyrimidine und Acetylpyrimidine. Dihydrouracil und die Purinmuttersubstanz Inosin zählen zu den seltenen Basen (p. 34 in 20).

Die Sekundärstruktur der DNA wird bei Erhitzung über

70° C und rascher Abkühlung verändert. Dabei dissoziiert die Doppelhelix durch Spaltung der Wasserstoffbrücken ganz oder teilweise in Einzelstränge. Auch andere physikalische (ionisierende Strahlen, UV-Licht, Ultraschall) oder chemische (Desaminierung, Nukleasen) Einflüsse können die Sekundärstruktur der DNA und damit ihre funktionellen Eigenschaften verändern (18, 36, 39, 70, p. 110 in 96, 126, 188).

Synthetische Polynukleotide werden entsprechend ihrem Zuckeranteil auf verschiedenen Wegen synthetisiert:

Synthetische Ribonukleinsäuren werden an der Polynukleotidphosphorylase aus verschiedenen Nukleosiddiphosphaten polymerisiert. Diese von einem "Primer" abhängige Reaktion erfolgt durch Ankondensation von 5'-Nukleosiddiphosphaten an ein vorhandenes Oligonukleotid unter Abspaltung von anorganischem Phosphor.

Synthetische Desoxyribonukleinsäuren werden an der DNA-Polymerase aus Nukleosidtriphosphaten unter Abspaltung von Pyrophosphat, z. T. ebenfalls "Primer"-abhängig (so bei Poly(dA)), aufgebaut (p. 68 und 76 in 20, 126).

Die chemische Zusammensetzung dieser Polynukleotide ist abhängig von der Art und Menge der angebotenen Bausteine. Befinden sich im Ansatz nur Nukleotide gleicher Basen, kommt es zur Bildung homopolymere Stränge [wie Poly(rI), Poly(rC), Poly(rG), Poly(rA), Poly(rU), bzw. entsprechender Desoxyribose-haltiger Polynukleotide mit der Schreibweise Poly(dC) usw.] unterschiedlicher Sekundärstruktur: so liegt Poly(dC) als Doppelhelix und Poly(rI) als 3strängiges Hybrid vor. Basenkomplementäre, homopolymere Nukleotidstränge bilden eine Doppelhelix aus, wie z. B. Poly(rA)·Poly(rU), Poly(rG)·Poly(rC), Poly(rI)·Poly(rC), Poly(rA)·Poly(rI), Poly(rI)·Poly(rBrC), Poly(rI)·Poly(dC), Poly(dI)·Poly(dC) u. a. . An diese Doppelhelices können u. U. noch weitere Homopolymere anhybridisieren, so an Poly(rA)·Poly(rU) noch ein zweiter Poly(rU)-Strang über das C 2-Carbonyl an die 6-Aminogruppe des Adenins (Poly(rA)·2Poly(rU)). Während von Poly(rA)·Poly(rI) eine dreisträngige Form Poly(rA)·2Poly(rI)

möglich ist, liegt $\text{Poly(rI)} \cdot \text{Poly(rC)}$ nur doppelsträngig vor (p. 76 in 20, 39, 126).

Abhängig von ihrer Primärstruktur besitzen auch synthetische homopolymere Nukleotide unterschiedliche Codierungseigenschaften. So tragen einige doppelsträngige Ribonukleinsäuren die Information zur Bildung verschiedener "Nonsense"-Proteine, wie $\text{Poly(rI)} \cdot \text{Poly(rC)}$ für ein Prolinpolypeptid oder $\text{Poly(rA)} \cdot \text{Poly(rU)}$ für ein Phenylalaninpolypeptid (112, 181).

Befinden sich im Ansatz 2 verschiedene Nukleosiddiphosphate bzw. -triphosphate, entstehen copolymere Stränge mit alternierenden Basen (Poly(rA-rU) , Poly(rI-rC) , Poly(rA-rBrU) , Poly(rI-rBrC) , Poly(dA-dT) , Poly(rA-dU) u. a.). diese Copolymere sind helikal aufgebaut. Da sie sich periodisch selbstkomplementär sind, besteht abschnittsweise eine doppelhelikale Faltung (p. 76 in 20, 39, 126).

Eine besondere Form modifizierter DNA ist die Apurinsäure, die nur aus Desoxyribose-haltigen Pyrimidinnukleotiden aufgebaut ist und eine gegen enzymatischen Abbau resistente 3'-OH-Gruppe besitzt (66, 74).

2.2. Struktur-Wirkungsbeziehungen

Polyanionen verschiedenster Struktur reagieren aufgrund von elektrostatischen Wechselwirkungen unter Komplexbildung stöchiometrisch mit Polykationen (152, 160). Die Reaktion ist von dem makromolekularen, polyanionischen Charakter dieser Verbindungen abhängig, der sich aus Molekulargewicht (s. Tab. 4) sowie Art, Verteilung und Dichte der negativen Gruppen ableitet, und kann durch Faktoren, die die Dissoziierbarkeit dieser anionischen Gruppen verringern, wie steigender pH oder zunehmende Konzentration (v. a. divalenter) Kationen, beeinflusst werden (14, 68).

Tab. 4: Mindestmolekulargewichte einiger Polyanionen als Voraussetzung biologischer Wirksamkeit

Polyanion	MG	Wirkung	Lit.
Dextransulfat	7000	Gerinnungshemmung	130
Pyran-Copolymer	17000 - 30000	Antikörperbildung	47
Poly-L-Aspartat	5600	Derepression d. DNA	120
Polyacrylsäure	4680	Derepression d. DNA	120
Poly(rI)	22000 - 66 000	Derepression d. DNA	120
Poly(rI)·Poly(rC)	$0,9 \times 10^6$	Virushemmung	127

So bilden nukleotidhaltige und nukleotidfreie Polyanionen mit Polykationen Präzipitate (bei nativer DNA in Form von Klümpchen und Strängen), wobei der Umfang der Reaktion neben der o.e. polyanionischen Struktur und den Milieubedingungen von der unterschiedlichen relativen Bindungsstärke der Polykationen beeinflusst wird (Poly-L-Lysin > Protamin > Histone > Viomycin > Neomycin > Polymyxin > Kanamycin > Spermin > Dihydrostreptomycin) (160). Auch die Metachromasie des basischen Farbstoffs Toluidinblau in Gegenwart von Heparin oder Nukleinsäuren beruht auf derartigen elektrostatischen Wechselwirkungen (130, 172).

Die molekularbiologischen Wirkungen von Polyanionen sind zunächst ebenfalls durch dieses unspezifische Wechselwirkungsprinzip bedingt:

Zwischen anionischen Polyelektrolyten und polykationischen Enzymproteinen bilden sich Komplexe. Gleichzeitig kommt es zur Verschiebung des isoelektrischen Punktes (IEP) und zu Änderungen der Aktivität des Enzymproteins (25, 89, 120, 145, 178). Der Einfluß von Polyanionen auf Nukleinsäure-abhängige Prozesse beruht

- a) auf elektrostatischer Wechselwirkung mit dem kationischen Enzym,
- b) Polyanionenkonkurrenz um die aktiven Gruppen des jeweiligen Enzymsystems (17, 58, 158, 159),
- c) Veränderungen der Sekundärstruktur des Substrats, wobei eine zusätzliche Reaktionsbeeinflussung durch derart veränderte Substrate nicht vollständig ausgeschlossen werden kann (186).

Dem molekularen Wirkungsmechanismus entsprechend hängt auch die biologische Wirksamkeit von Polyanionen entscheidend von den o. e. Strukturmerkmalen (s. Tab. 4) sowie vom Säurecharakter der anionischen Gruppen ab. Steigende Anzahl und zunehmende Dissozierbarkeit dieser Gruppen erhöht die Wirkung saurer Polymere (33, 68, 102, 120, 130, 145, 151, 158, 159, 178). So sind carboxylierte Polyanionen geringer wirksam als sulfatierte (145). Durch Sulfatierung können Polyanionen in ihrer Wirkung verstärkt werden; als Beispiel sei das gerinnungsinactive β -Heparin erwähnt, das erst nach Beladung mit Schwefelsäureresten gerinnungshemmend wirkt (130).

Im allgemeinen läßt sich die Polyanionenwirkung durch Polykationen reduzieren oder aufheben (130, 152, 159, 181), wie die Heparinwirkung durch organische Kationen, z. B. Protamin, das als spezifisches Antidot bei Heparinüberdosierung eingesetzt wird (130).

Diese Hemmwirkung von Polykationen trifft generell für alle In vitro- und viele In vivo-Reaktionen zu. Muß das Polyanion die Zellmembran passieren, um an seinen Wirkungsort zu gelangen, kann u. U. seine Wirkung durch Polykationen verstärkt werden, da diese die Oberflächenladung der Zellmembran reduzieren und dadurch die Adsorption an die Zelloberfläche und die Membranpermeabilität für das Polyanion erhöhen (38, 48, 183).

Obwohl der Wirkungsmechanismus der Polynukleotide zunächst auf dem gleichen unspezifischen Prinzip elektrostatischer Wechselwirkungen beruht (17, 89, 181), ist zusätzlich über Interaktionen einzelner Basen mit der Möglichkeit größerer Spezifität zu rechnen (181).

In komplexen biologischen Systemen können Polynukleotide, noch bevor sie ihren Wirkungsort erreichen, durch Nukleasen-Aktivitäten in ihren makromolekularen Eigenschaften verändert werden. Nukleotidhaltige Polyanionen sind daher umso wirksamer, je höher ihre Resistenz gegenüber Nukleasen ist (39). Diese hängt sowohl von der Sekundär- als auch von der Primärstruktur der Nukleinsäuren ab (18, 39, 105, 158, 159). So sind Verbindungen mit ausgeprägter Sekundärstruktur gegenüber enzymatischem Abbau wesentlich widerstandsfähiger (Doppelhelix > Hybrid > Einzelstrang) (39, 46). Chemische Modifikation der Basen, z. B. durch Einführung von Schwefel oder Brom und ein dadurch bedingter erhöhter Gehalt an seltenen Basen, steigert die Nukleasenresistenz infolge Veränderungen der Bindungsstellen für die Enzyme am Substratmolekül (Tab. 5) (39).

Tab. 5: RNase-Sensitivität einiger synthetischer Ribonukleinsäuren als pro Stunde und pro mg RNase umgesetzte μmol Polynukleotid.

Polynukleotid	RNase-Sensitivität
Poly(rI)·Poly(rC)	3,8
Poly(rI-rC)	17
Poly(rI)·Poly(rBrC)	1,4
Poly(rA)·Poly(rU)	13
Poly(rA-rU)	110
Poly(rA-rBrU)	41
Poly(rG)·Poly(rC)	0,02

(39)

Auch durch Reduzierung der Nettoladung (Beladung von Polyanionen mit Polykationen) entsteht eine Schutzwirkung gegenüber Nukleasen (6, 39).

Die starke Nukleasensensitivität einsträngiger Polynukleotide kann durch Verunreinigung mit Polykationen oder durch Ausbildung einer Knäuelstruktur verringert sein, wodurch auch solche Polynukleotide eine gewisse biologische Wirksamkeit zeigen können (39).

Am Wirkungsort sind die strukturellen Voraussetzungen der biologischen Wirkung von Polyanionen die gleichen, nämlich hohes Molekulargewicht sowie geordnete und dichte Folge von negativen Ladungen auf dem langkettigen Rückgrat des Moleküls (39).

2.3. Wechselwirkung von Polyanionen mit verschiedenen biologischen Systemen

2.3.1. Zellfreie Systeme und subzelluläre Einheiten

2.3.1.1. Zellkerne und DNA-Stoffwechsel

Unter der Wirkung von Polyanionen (wie Heparin, Dextransulfat, Polystyrensulfonat, Poly-L-Aspartat, SP_{54} , exogener DNA, Poly-ADP-ribose, Apurinsäure u.a.) entstehen umfangreiche Disaggregationen des Chromatins, wobei der Kernumfang bis auf das 3fache zunehmen kann ^{*)} (8, 14, 49, 101, 120, 153); Pyran-Copolymer bewirkt teilweise Lysis des Kerns (153). Elektronenmikroskopisch zeigt sich unter genereller Aufhellung das Chromatin teilweise "dekondensiert" und von der Kernmembran abgelöst (8, 21, 25, 40, 153). Die anfänglich eingeschnürten Chromatinfasern besitzen nach Auffaltung und Ausdehnung eine verringerte Faserdicke. Als Ursache kommt wahrscheinlich die Aufhebung der "super-coil"-Struktur der DNA in Frage, da sich die DNA ausdehnt, sobald die Chromatinfasern ihre kreuzweisen Verbindungen durch basische Histone verloren haben (40). Diese Arginin- und Lysin-reichen Nukleohistone sind Bestandteile der Desoxyribonukleoproteide (DNP) und als Poly-

*) Stimulierung des Zellkernstoffwechsels führt über Chromatinstrukturänderungen zu einer Vergrößerung des Kerns (153).

kationen mit relativ hoher Bindungsstärke geeignet, mit Polyanionen Komplexe zu bilden (13, 32, 49, 119, 120, 160, 161, 168). In Heparin-behandelten Kernen lassen sich derartige Komplexe aus freien Histonen und Heparin in Form amorpher Kügelchen, sog. "microspheres", nachweisen (40). Am Chromatin kommt es durch Wechselwirkung zwischen Polyanionen und der Histonfraktion nicht, wie früher vermutet, zu einer Verdrängung des schwächeren Polyanions durch das stärkere, sondern zur Bildung eines DNP-Polyanion-Komplexes (120, 163). Die hierbei auftretenden Konfigurationsänderungen im DNP-Komplex bewirken eine Labilisierung der DNA-Protein-Bindung. Sie geht mit erhöhter Freisetzung der DNA aus dem DNP-Komplex einher (120, 161, 163) und äußert sich in zunehmender Solubilisierung des Chromatins (Abb. 3) (25, 120). In röntgenbestrahltem Chromatin genügen zur "Freilegung" der DNA wesentlich geringere Polyanionendosen, da durch die Strahlenwirkung die DNA-Protein-Bindung bereits gelockert und das Histonverhältnis zugunsten der Arg-reichen F_3 -Histone verschoben sind, die zu Heparin die höchste Affinität aller Histonfraktionen besitzen (120, 161).

Durch die Abdissoziation von Nukleohistonen entstehen unter dem Einfluß von Polyanionen längere Strecken freigelegter, "dereprimierter" DNA und damit ein größerer Anteil an verfügbarer Matrize mit neuen DNA-Syntheseorten. Diese veränderten Matrizenverhältnisse führen zu einer Steigerung der DNA-Polymerase-Aktivität, die sowohl exogene als auch kerneigene DNA-Polymerase betrifft. Letztere liegt bei Teilungsruhe in Form inaktiver, an die Kernmembran gebundener Chromatin-Polymerase-Komplexe vor und wird über die durch Polyanionen bewirkte Ablösung von der Membran aktiviert (21, 25, 40, 63, 101, 120, 163). Die daraus resultierende Erhöhung der DNA-Syntheserate ist von der Polyanionendosis und der Art der Matrize abhängig. So steigern kleine Heparindosen den Einbau von ^{14}C -Thymidin in Zellkerne von Thymocyten um 30 - 40 %, während höhere Dosen die Kernstruktur zerstören (162).

Abhängig vom Umfang der Derepression der angebotenen Matrize können Polyanionen die DNA-Synthese sowohl fördern als auch hemmen:

Bei reiner DNA (163) oder aktivem (dereprimiertem) Euchromatin (63) wird die DNA-Synthese gehemmt, da hierbei die Polyanionen keine Histone binden müssen und deshalb vollständig mit dem Substrat um das DNA-Polymerase-System konkurrieren können. In Zellkernen (163), Chromatinfractionen (40) oder Heterochromatin (63) stimulieren Polyanionen durch ihre Derepressorwirkung in niedrigen Dosen die DNA-Synthese, während höhere Dosen bereits wieder in Wechselwirkung mit den Enzymen treten können (Abb. 3) (163).

Strukturmerkmale der nukleotidhaltigen Polyanionen können den Reaktionsablauf auf verschiedenen Ebenen beeinflussen. Purinnukleotide z. B. erhöhen die Matrizenverfügbarkeit in größerem Umfang als Pyrimidinnukleotide; im Poly(rI)·Poly(rC) besitzt nur der Poly(rI)-Strang Wirkung auf die Matrizenaktivität (25). Die Starter-abhängige DNA-Synthese kann durch exogene DNAs, die Primeraktivität besitzen, verändert werden. Als optimale Primer wirken DNAs mit freien 3'-OH-Gruppen, wie DNA nach Behandlung mit DNase I (65) oder die Apurinsäure, die jedoch nach Abbindung der 3'-OH-Gruppen durch Überlagerung mit dem Matrizen-Primer-System die DNA-Polymerase hemmt (66).

Im DNP-Komplex ist das DNA-Molekül durch Histone gegenüber DNasen geschützt. Nach Freilegung durch Polyanionen ist die DNA besser für DNasen angreifbar, die speziell an den zur Replikation oder Transkription aufgedeckten Stellen ansetzen (120, 163). So können Polyanionen, wie Heparin oder Pentosanpolysulfat, die Abbaurate der DNA im DNP auf die Rate reiner DNA beschleunigen (14). Die verstärkte Abbaubarkeit dereprimierter DNA durch DNasen unter Polyanionenwirkung ist jedoch insoweit beschränkt, als Polyanionen mit dem Enzymprotein der DNasen, zu dem sie eine hohe Affinität besitzen, Komplexe bilden und dadurch die DNase-Aktivität hemmen (17, 89, 158, 169, 178). Die DNase I wird durch Heparinoide nur in höheren Konzentrationen (186) und nicht-kompetitiv gehemmt. Wesentlich geringere Polyanionenkonzentrationen genügen demgegenüber, um die DNase II zu inaktivieren. Die Art der Inaktivierung folgt hierbei dem Typ einer kompetitiven Hemmung (169, 178). Sie ist z. B. - außer durch Erhöhung der DNA-Konzentration - durch Veränderung

der Ionenstärke rückgängig zu machen (maximale Hemmung nur im pH-Optimum und bei höheren pHs). Dabei brechen die Ionenbindungen zwischen den beiden komplexbildenden Komponenten auf: das Polyanion, das entweder an das aktive Zentrum gebunden ist oder es mas-kiert, kann wieder abdissoziieren (178).

Die Hemmwirkung von Polyanionen erstreckt sich auch auf Endonukleasen aus Mikroorganismen (17, 54) und gilt für alle Polyanionen, außer für Desoxyribose-haltige Polynukleotide, sowie für Poly(rA) und Poly(rC) (17). Der Umfang der Reaktion hängt allerdings von Art und Konzentration der Reaktionspartner ab: So bewirken starke Polyanionen, wie PVS und Bentonit, in geeigneten Konzentrationen eine vollständige Hemmung der DNase II in Rattenleberhomogenaten und -mikrosomen (102). Synthetische, RNA-ähnliche Polynukleotide wirken im Gegensatz zu natürlich vorkommenden RNAs nur gering auf die Endonuklease aus E. coli, während die Plasma-DNase I (nicht jedoch die aus dem Pankreas stammende) von allen (synthetischen und natürlichen) RNAs gehemmt wird (54).

Die möglichen Reaktionsabläufe im DNA-Protein-Polyanionen-Enzym (DNase II)-System sind in Abb. 3 schematisiert. Sie hängen von Polyanionendosis und dem Enzym-Substrat-Verhältnis ab. Die Reaktionen (3) und (5) treffen für die DNase I nur bei sehr hohen Polyanionen-konzentrationen zu (163).

(1)		DNA - - Enzym	Enzym in Aktion
(2)	Histon = =	DNA -/- Enzym	Histon schützt die DNA
(3)		DNA -/- Enzym Polyanion	Enzym durch Polyanion gehemmt
(4)	Histon \ =/= Polyanion	DNA - - Enzym	Polyanion entfernt Re- pressorhiston von der DNA
(5)	Histon \ =/= Polyanion	DNA -/- Enzym Polyanion	Enzym durch Polyanionenüberschuß gehemmt

Abb. 3: Mögliche Beeinflussung der Reaktionsabläufe im DNA-Protein-Enzym (DNase II)-System durch Polyanionen (nach 163).

Die - vorläufig noch hypothetische - biologische Bedeutung von Wechselwirkungen zwischen Polyanionen und Chromatin liegt möglicherweise in der Genregulation auf Chromatinebene. Sie könnte in biologischen Systemen von Phosphorproteinen (einem Anteil der Nichthiston-Proteinfraction) und anderen Polyphosphaten unter Änderung ihres Polymerisationsgrades erfolgen (63, 120, 163).

Neben den geschilderten Wirkungen auf Chromatinstrukturen, DNA-Polymerase- und DNasen-System beeinflussen Polyanionen auch noch andere Enzymsysteme, die in den DNA-Stoffwechsel z. T. mit Regulationsaufgaben eingeschaltet sind. So hemmen natürlich vorkommende RNAs und Poly(rC) kompetitiv die Ribonukleotid-Reduktase, ein zytoplasmatisches Enzym, das v. a. in Zellen mit intensivem DNA-Stoffwechsel vorkommt (42).

Auch die von onkogenen RNA-Viren gesteuerte DNA-Synthese wird sowohl auf der Basis der RNA-DNA-Transkription durch Hemmung der Umkehrtranskriptase ("reverse transcriptase"), einer RNA-abhängigen DNA-Polymerase, als auch im Bereich der DNA-DNA-Transkription durch Heparin und geringer durch Heparinoide und Poly(rI)·Poly(rC) gehemmt (97, 117).

2.3.1.2. RNA- und Proteinstoffwechsel

Polyanionen beeinflussen den Nukleinsäurestoffwechsel auch auf der Ebene der Transkription, da durch die Freilegung der Matrizen-DNA unter Entfernung der Histone auch die Repression der RNA-Synthese abnimmt (63, 116, 153). Unter Polyanionenwirkung wird die RNA-Synthese in Heterochromatinfractionen gesteigert, während die Reaktion in Euchromatin einen geringeren und im Falle RNA-ähnlicher Polynukleotide unterschiedlichen Umfang aufweist. Die Unterschiede verschiedener RNAs hinsichtlich ihrer Wirkung auf Euchromatin hängen weniger vom polyanionischen Charakter als von der Primär- und Sekundärstruktur dieser Verbindungen und ihrem dadurch bedingten Hybridisierungsverhalten mit der DNA ab. So ist z. B. Kalbsthymus-RNA im Gegensatz zu Hefe-RNA

unwirksam (63).

Die Zunahme an verfügbarer Matrize führt nur dann zu einer Steigerung der RNA-Syntheserate, wenn die RNA-Polymerase in einem Bindungszustand vorliegt, in dem sie von Polyanionen nicht gehemmt werden kann. Das Enzym besitzt in der dimeren (24 S-) Form zwei Bindungsstellen für Polyanionen, die beide zur Hemmung besetzt sein müssen. Zur Inaktivierung von 1 Mol RNA-Polymerase sind daher 2 Mol eines Polyanions notwendig (184). Als weitere Ursachen einer Hemmung der RNA-Polymerase-Reaktion kommt die Dissoziation des Enzym-Matrizen-Komplexes unter Polyanionenwirkung in Betracht, wobei das Polyanion am Enzymprotein die Bindungsstelle für die Matrize abdeckt (131). Dagegen wird das synthetisierende oder passiv im DNA-RNA-Polymerase-RNA-Komplex bzw. an Chromatin gebundene Enzym ("aggregate enzyme") nicht oder nur geringfügig gehemmt, da in diesen Komplexen beide Bindungsstellen bereits besetzt sind (9, 33, 34, 141). Z. B. steigern PVS und Polyäthylensulfonat die RNA-Synthese am Chromatin über das "aggregate enzyme" durch ihre Derepressorwirkung bis zu 30 % (9, 34).

Entsprechend ihrem Verhalten gegenüber DNasen wirken saure Polymere auch als Inhibitoren von RNasen (58, 102, 159). So hemmen sie die Pankreas-RNase kompetitiv, wobei die meisten Polyanionen stärker wirksam sind als Heparin. Der Umfang der Enzyminaktivierung nimmt mit steigender NaCl-Konzentration durch Stabilisierung des Enzym-Substrat-Komplexes bzw. Labilisierung der Enzym-Inhibitor-Bindung ab (58).

Außer einigen RNA-ähnlichen Polynukleotiden hemmen Polyanionen die zellfreie Proteinsynthese unter Beeinflussung der Translationsvorgänge auf verschiedenen Ebenen (81, 181). Polyanionen (z. B. PVS) bewirken eine Dissoziation gereinigter 80 S-Ribosomen aus Pflanzenblättern, Hefen und Kaninchenerythrozyten in 50 S- und 34 S-, solcher aus Pflanzenblättern und Kaninchenerythrozyten auch in 70 S- und 100 S-Untereinheiten (180). Polyanionen können sich mit 70 S-Ribosomen auch zu Komplexen von Polysomen-ähnlicher Struktur verbinden (1). Daneben konkurrieren alle Polyanionen mit der

tRNA um die in die Proteinsynthese eingeschalteten polykationischen Enzyme. Diese (unspezifische) Hemmwirkung kann durch Polykationen (Polylysin, Protamin) oder durch tRNA aufgehoben werden. Spezifischer ist dagegen die Hemmung durch bestimmte RNA-ähnliche Polynukleotide: diese können mit der mRNA eine Doppelhelix bilden, wodurch die mRNA ihre Codeeigenschaften für das Anticodon in der tRNA verliert. So hemmt z. B. Poly(rA) den Einbau von Phenylalanin an Poly(rU) durch Bildung eines Doppelstranges mit Poly(rU) (181).

2.3.1.3. Zellatmung in den Mitochondrien

Polyanionen beeinflussen in Mitochondrien wahrscheinlich Polykationen (vorwiegend Histone), die bei der Zellatmung - durch Einwirkung auf die mitochondriale ATPase - Regulationsaufgaben erfüllen (145).

2.3.1.4. Enzyme

Die Aktivität vieler Enzyme und anderer biologisch aktiver Proteine wird in vivo durch Polyanionen gehemmt (s.u. 2.2.). Der Mechanismus ist unspezifisch und beruht auf elektrostatischen Wechselwirkungen mit den Enzymproteinen unter Verschiebung des IEP (25, 68, 89, 114, 120, 145). So können z. B. durch Heparin in Abhängigkeit von Konzentration und pH folgende Enzyme und -systeme in vitro gehemmt werden:

β-Amylase	Pepsin
DNasen	alkalische und saure Phosphatasen
Elastase	Phosphomonoesterase der Erythrozyten
Fumarase	
β-Glukuronidase	Proteasen
Heparinase	RNasen
Hyaluronidase	Staphylokoagulase
Kathepsin	Trypsin und Chymotrypsin
Lecithase des Bienen- und Kobragifts	Neuraminidase
Lysozym	mehrere Blutgerinnungsfaktoren
(68, 114)	

2.3.2. Isolierte Zellen und Zellkulturen

2.3.2.1. Zelluläre Aufnahme

Polyanionen können wie alle anderen makromolekularen Stoffe mit einer Molekülgröße über 50 Å die Zellmembran nicht passieren. Soweit Makromoleküle nicht extrazellulär zu kleineren, permeationsfähigen Einheiten abgebaut werden, erfolgt die zelluläre Aufnahme solcher Moleküle über Endozytosemechanismen (vorwiegend Pinozytose) (7, 121, 146). Der erste Schritt dabei ist die Adsorption des Polyanions an die Zellmembran in Abhängigkeit von der Oberflächenladung. Durch Polykationen, die die Oberflächenladung reduzieren und Orte mit Überschuß an positiven Ladungen schaffen, kann die Bindung wesentlich erhöht werden (48, 95, 121, 122, 183). Anschließend wird das Makromolekül in eine Vakuole eingeschlossen, durch Pinozytose in das Zytoplasma überführt und nach Abbau der Vakuolenmembran in lysosomale und lysosomogene Strukturen eingelagert (7, 146). Soweit intrazellulär kein Abbau durch spezielle Enzymsysteme erfolgt (z. B. durch Nukleasen oder Heparinase), besitzen Polyanionen mit einem MG über 5000 aufgrund ihrer Größe eine hohe Verweildauer; da Polyelektrolyte in Lösung Knäuelstruktur besitzen und somit ein großer Teil der reaktionsfähigen Gruppen abgedeckt ist, werden solche Makromoleküle langsamer als entsprechende niedermolekulare Verbindungen umgesetzt (148).

Polynukleotide, v.a. native Nukleinsäuren, werden strukturabhängig selektiv an die Zelloberfläche gebunden und gelangen in vivo nach teilweisem enzymatischen Abbau durch Nukleasen in noch makromolekularer Form direkt und nicht mittels Endozytose in das Zellinnere (61). Die Fähigkeit zur Membranpassage beruht sowohl auf veränderten makromolekularen Eigenschaften der Polynukleotide als auch auf Konformationsänderungen der Zelloberfläche (121, 122, 134, 135). Veränderungen der Oberflächenladungsverhältnisse und polyanionenbedingte Freisetzung lipolytischer Enzyme führen zu strukturellen und funktionellen Änderungen der Zellmembran (113).

RNA wird über positive Bindungsstellen innerhalb der Zelle nahe der Membran gebunden. Dadurch entstehen lokale Ladungsassymmetrien, die durch starke "Transmembranfelder" eine Instabilität der Membran bewirken. Bei gleichzeitiger Gabe von Polykationen werden Orte mit Überschuß an positiver Ladung gebildet, die als externe Bindungsstellen für exogene RNA fungieren und eine noch größere Instabilität der Membran bedingen (134, 135).

RNA-ähnliche synthetische Polynukleotide werden in unterschiedlichem Umfang an die Zelle gebunden und aufgenommen. So können in Kulturen von Ehrlich-Aszites-Tumorzellen Polynukleotide wie Poly(rA), Poly(rI) und Poly(rA-rU) leicht an die Zellmembran gebunden und in die Zelle aufgenommen werden, während Poly(rU), Poly(rC) und Poly(rI-rC) trotz (allerdings geringerer) Adsorption nicht in die Zelle gelangen (122, 154).

DNA wird in großer Menge an die Zellmembran gebunden, nach Nukleaseneinwirkung aber nur mit einem kleinen Teil in die Zelle aufgenommen (61). Hitzedenaturierte DNA, die besser als native DNA an die Zelloberfläche adsorbiert wird, kann die Zellmembran nicht permeieren, DNase-behandelte DNA gelangt erst nach einer längeren Lag-Phase in die Zelle (72). Intrazellulär wird die aufgenommene DNA entweder in die Wirts-DNA eingebaut oder als extrachromosomales Material deponiert (61). Obwohl die Zelle nicht in der Lage ist, bei der Aufnahme zwischen homologer und heterologer DNA zu unterscheiden, kann sie selektiv die Inkorporation verschiedener DNAs steuern. So wird homologe DNA ohne wesentliche Veränderungen eingebaut, während heterologe DNA an DNase II oder Kern-DNase zu Mono- und Oligonukleotiden abgebaut wird (95, 123). Insgesamt wird nur ein geringer Anteil der exogenen DNA in das Wirtsgenom in Form einer End-zu-End-Ankondensation integriert: dabei können allerdings Änderungen in der genetischen Charakteristik der Wirtszelle eintreten. Beispiele sind gehäuftes Auftreten von pigmentierten Flecken bei Drosophila, Anstieg der Anthocyan-Synthese in Petunien oder spontanes Auftreten pigmentierter Zellen im amelanotischen Melanom. Jedoch tritt die Transformation eines spezifischen genetischen Merkmals unter der Einwirkung exogener DNA nur in etwa 0,1 % der be-

troffenen Zellen auf (61, 165, 168).

Die Aufnahme von Polyanionen in die Zelle ist nicht nur von Membranfaktoren abhängig, sondern auch mit dem Stand der Zelle im Zellzyklus und ihrer Mitosefähigkeit korreliert. So können Polyanionen überwiegend nur in solche Zellen aufgenommen werden, die sich in der G 1-Phase befinden und zur Mitose fähig sind (14).

2.3.2.2. Zellteilung

Polyanionen hemmen die Zellteilung in vielen biologischen Systemen. Dazu gehören tierische Tumoren ebenso wie Gewebekulturen aus normalen und malignen Zellen (Tab. 6) (7, 144).

Tab. 6: Beispiele für die Hemmung der Zellteilung in verschiedenen Gewebekulturen durch Polyanionen

Zellkultur	Polyanion	Literatur
Fibroblasten (Mensch)	Heparin, SP ₅₄	69, 135
Fibroblasten (Maus)	Heparin, SP ₅₄	69
L 1210 (Mäuseleukämie)	DNA (aus Mäusethymus, -leber, -milz)	71
S - 37 (Mäusesarkom)	Heparin, DNA (aus Mäusethymus)	135, 71
S - 180 (Mäusesarkom)	Heparin, DNA (aus Mäusethymus)	135, 71
S - 45 (Rattensarkom)	PVS	151
Chem. ind. Tumoren durch Methylcholanthren	Heparin	69
DMBA (Dimethylbenzanthrazen)	Poly(rI)·Poly(rC)	117
MNNG (N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidin)	Poly(rI)·Poly(rC)	117

Die Ursachen umfassen u. a. physikalisch-chemische Wechselwirkungen mit verschiedenen Zellbestandteilen. Durch Ladungsveränderungen an der Zellmembran kommt es zu Permeabilitätsdefekten und Beeinflussung interzellulärer Reaktionen. Die daraus resultierenden zytotoxischen Defekte werden zum Teil als zelluläre Autolyse durch Schädigung der Lysosomenmembran erklärt (113, 121, 134, 135, 170, 173). Während einige Polyanionen (so PVS oder Poly(rI)·Poly(rC)) schon in relativ geringen Konzentrationen zytotoxisch wirken und wie Poly(rI)·Poly(rC) eine ihrer Zytotoxizität proportionale Hemmwirkung auf das Wachstum von Tumorzellkulturen zeigen (92, 93), führen andere Polyanionen bereits in Konzentrationen, in denen sie noch keine erkennbaren zytotoxischen Wirkungen zeigen, zu einer Abnahme der Mitoserate. Die Ursache hierfür wird u. a. in einem durch Polyanionen bewirkten Viskositätsanstieg gesehen, der die prämitotische Gelierung des Protoplasmas (Spindelbildung) verhindert (69).

Wahrscheinlicher ist jedoch eine Zellteilungshemmung durch direkten Eingriff in den intrazellulären Makromolekül-Stoffwechsel (43, 69, 71, 97, 134, 135); Polyanionen bewirken auch in situ eine Kernschwellung bis zu 50 % mit Verringerung der Chromatinaggregation und Zunahme von DNA- und RNA-Synthese (13, 14, 43, 163). - Unter Heparinwirkung erhöht sich der Einbau von ^3H -Thymidin in die DNA von Knochenmarkszellen um das Doppelte (43, 163). - Die Wirkung von Polyanionen auf die DNA-Synthese ist allerdings vom Zellzyklus abhängig: In der S-Phase wird die DNA-Synthese gesteigert, während der Einbau von ^3H -Thymidin (Untersuchungen an normalen und hyperplastischen Epidermiszellen) in der späten G 1-Phase oder beim Übergang von der G1- zur S-Phase gehemmt wird (56).

Der Einbau radioaktiv markierter Vorstufen in Protein ist unter dem Einfluß von Polyanionen verringert. Als Ursachen sind sowohl die beschriebenen Interferenzen der Polyanionen mit Mechanismen der Translation als auch Störungen des Transports der Aminosäuren zu den Syntheseorten in Betracht zu ziehen (111, 112).

Möglicherweise sind die Abnahme der Proteinsynthese und die Persistenz neugebildeter RNA-Moleküle Ursachen der Zellteilungshemmung. RNA-Moleküle häufen sich aufgrund eines durch RNase-Hemmung verminderten RNA-Umsatzes im Zytoplasma an und können so zum Zelluntergang führen (43, 69).

Einige Polyanionen besitzen daneben noch andere Hemmechanismen. So beruht die antimittotische Wirkung von Poly(rI)·Poly(rC) - neben der Interferoninduktion in bestimmten (v.a. virusinduzierten) Tumorzellen - auf einer Hemmung der gesamten Makromolekülsynthese, wobei Tumorzellen empfindlicher sind als Normalzellen (39, 110, 111), während Apurinsäure selektiv die DNA-Synthese durch Überlagerung des Matrizen-Primer-Systems hemmt (s.u. 2.3.1.1.) (66, 74).

Die Wirkungen einzelner Polyanionen, z. B. von Heparin, auf die Zellproliferation in Gewebekulturen (so Verkürzung der Lag-Phase, Erhöhung der Überlebensrate, Verlängerung der Mitosespanne, Hemmung des Auswachsens kleiner Zellinocula (134, 135)) ist wegen der Abhängigkeit von vielen, teilweise schwer systematisierbaren Faktoren nur in beschränktem Umfang verallgemeinerungsfähig. Konzentration und Struktur des Polyanions, betroffener Zelltyp und Mitosestadium sind bestimmende Faktoren:

Niedermolekulare Polyanionen sind, solange sie die Zellmembran leicht im Komplex mit Lipoproteiden passieren können, wirksamer als höhermolekulare Verbindungen. SP₅₄ z. B. hat mit MG 1500 eine starke, mit MG 5000 keine Hemmwirkung auf die Zellteilung (69).

Die DNA-Wirkung ist teilweise durch spezifische Nukleotidsequenzen bedingt, an denen (so an Mäusethymus-DNA in verschiedenen Mäusetumorzellen) spezielle RNA transkribiert werden kann (43, 71).

Frühe "Subkulturen" z. B. von normalen menschlichen Fibroblasten sind leichter als bereits "etablierte" Zellen, Tumorzellen leichter als Normalzellen beeinflussbar (134, 135). In dichten Kulturen etablierter Normalzellen können Polyanionen die Zellvermehrung durch Wechselwirkung mit dem Mechanismus zur Regelung der Topoinhibition (über Derepression der DNA, Beeinflussung der interzellulären Re-

aktionen durch Änderung der Oberflächeneigenschaften) steigern (134).

Hefen werden von Polyanionen durch Hemmung der Zymase und anderer in die anaerobe Glykolyse eingeschalteter Enzyme beeinflusst (145).

Verschiedene Bakteriensysteme (wie *Staphylococcus aureus*, *Bac. stewartii*, *Micrococcus pyogenes*) können in ihrem Wachstum, v.a. wenn dieses B_{12} -abhängig ist, durch saure Polymere gehemmt werden, da diese (wie z. B. Heparin) starke Komplexe mit B_{12} bilden. Andere Bakteriensysteme hingegen können durch Heparin in ihrem Wachstum unterstützt werden (145).

2.3.2.3. Virostatische Wirkung

Stoffe mit polyanionischem Charakter können in Säugerzellen die Virusvermehrung durch die Induktion von Interferon hemmen (39, 62, 154, 182) ^{*)}. Da Interferon eine zelluläre Antwort auf das Eindringen fremder Nukleinsäuren ist, sind v.a. Polynukleotide neben einigen nukleotidfreien Polyanionen, wie Pyran-Copolymer, Polyacrylsäure, Polymethacrylsäure, Statolon (ein "präformiertes" Interferon) und Endotoxine, wirksam (39, 152).

Die Eigenschaft von Polynukleotiden, Interferon zu induzieren, zeigt ausgeprägte Strukturabhängigkeit. Sie ist bedingt

1. durch einen zellulären Rezeptor, der sowohl funktionelle Gruppen (wie die 2'-OH-Gruppe am Zucker) als auch die Basensequenz des Induktormoleküls erkennen kann. - Da dieser Rezeptor nur Ribosehaltige Polynukleotide und außerdem nur heterologe RNAs bindet, besitzen DNA-ähnliche Polynukleotide und homologe RNAs keine induzierenden Eigenschaften. Nur durch chemische Modifikation,

^{*)} Interferon hemmt die Virusvermehrung auf der Ebene der Translation durch spezifische, von der Zelle gebildete Interferon-Typ-Ribosomen, die nur an zelleigene und nicht an virale RNA binden (109).

z. B. Desaminierung, erhält auch homologe RNA geringe Wirksamkeit. -

2. durch die RNase-Sensitivität (s.u. 2.2.), die mit zunehmender Stabilität der Sekundärstruktur abnimmt. - Deshalb sind lediglich doppelsträngige RNAs (die wesentlich langsamer an RNase abgebaut werden als einsträngige oder hybridisierte RNA-ähnliche Polynukleotide) effektive Interferoninduktoren. Durch Faktoren, die die RNase-Sensitivität verringern, wie z. B. Erhöhung der Mg^{2+} -Konzentration oder zunehmender Gehalt an chemisch modifizierten Basen, kann die induzierende Wirkung von Polynukleotiden gesteigert werden (Tab. 7) (39). -

Tab. 7: Effektivität verschiedener synthetischer Polynukleotide bei der Interferoninduktion.

Kennzeichnung der Symbole:

Niedrigste Polynukleotidkonzentration für feststellbare Virusresistenz bei

++++ $\leq 0,002 \mu\text{g/ml}$

+++ $\leq 0,006 \mu\text{g/ml}$

++ $\leq 0,02 \mu\text{g/ml}$

+ $\leq 2,5 \mu\text{g/ml}$

0 $\geq 2,5 \mu\text{g/ml}$

Polynukleotid	Ind. eff.	Polynukleotid	Ind. eff.
Poly(rI) · Poly(rC)	++++	Poly(rC)	0
Poly(rI-rC)	+++	Poly(rG)	0
Poly(rI) · Poly(rBrC)	++	Poly(rA)	0
Poly(rG) · Poly(rC)	++++	Poly(rU)	0
Poly(rA) · Poly(rU)	+	Poly(rI) · Poly(dC)	0
Poly(rA-rU)	++	Poly(dI) · Poly(dC)	0
Poly(rA-rBrU)	++	Poly(rG) · Poly(dC)	0
Poly(rA) · 2Poly(rU)	0	Poly(dA-dT)	0
Poly(rI)	0	Poly(dA-dU)	0

1. Möglichkeit der Bildung von Gelen zwischen intakten, kernhaltigen Zellen und Polyanionen - v.a. Heparinoiden-- (solche Gele können einerseits wie Ionenaustauscherharze Viren binden und inaktivieren, andererseits als makromolekulare Siebe fungieren, die in Abhängigkeit von pH, Salzkonzentration, Virus- und Porengröße des Gels die Viren am Zutritt zur Zelloberfläche hindern),
2. Wirkung von Polyanionen auf bestimmte Rezeptoren an der Zelloberfläche,
3. Virusadsorption an die Polyanionen über einfache elektrostatische Bindungen mit den in den Viren enthaltenen Polyaminen,
4. Hemmung von Enzymen für die Virusadsorption, z. B. Lysozym oder Hyaluronidase (145),
5. Hemmung der intrazellulären Replikation - entweder durch Inaktivierung der Umkehrtranskriptase (97, 117) oder durch Beeinflussung der Makromolekülsynthese insgesamt (111) - und
6. selektive Hemmung der Endozytose für bestimmte Stoffe (besonders durch Heparinoide) (90).

2.3.3. Organismen

2.3.3.1. Pharmakokinetik

2.3.3.1.1. Nukleotidfreie Polyanionen

Heparin wird nach parenteraler Gabe schnell in Elemente des RES, wie Mastzellen, Fibroblasten, Kupffersche Sternzellen, Sinusendothelien der Milz, Retikulumzellen der roten Milzpulpa u.a. aufgenommen (79, 125, 166). Bereits 1,5 bis 4 h nach Verabreichung von ³⁵S-markiertem Heparin fällt die Aktivität im Plasma ab und steigt in Leber, Milz, Thymus, Dünndarmwand und Niere an, so daß nach 24 h das Aktivitätsverhältnis von Plasma zu Milz oder Leber 1 : 12 bis 14 beträgt (166). Vor allem in der Leber wird Heparin an der

Heparinase depolymerisiert und desulfuriert (67, 80), wodurch in den nächsten 24 h der Gehalt an intaktem Heparin abnimmt und sich die Aktivität in Faszien, Periost und Knorpelgewebe über sekundäre Markierung endogener Mukopolysaccharide aus dem Sulfatpool verschiebt (125, 166).

Die Ausscheidung erfolgt schnell über die gewundenen proximalen Tubuli der Nierenrinde als Uroheparin, das nur mehr ein Drittel der ursprünglichen Gerinnungsaktivität besitzt (67, 80, 166). Uroheparin stellt keine einheitliche Substanz dar, sondern ist eine variable renale Ausscheidungsgröße aus unverändertem Heparin und niedermolekularen, gerinnungsinaktiven Bruchstücken (67). In den ersten 48 h nach der Verabreichung werden 30 % des Heparins im Harn und nur 1 % in den Faeces ausgeschieden. Die biologische Halbwertszeit von Heparin beträgt 3,5 Tage (125).

Heparinoide werden hinsichtlich Geschwindigkeit und Verteilung dem Heparin ähnlich in zelluläre und subzelluläre Elemente des RES eingelagert (80, 125, 171, 175), wobei die Speicherkapazität der einzelnen Organe von ihrer Proliferationsrate abhängig ist (Milz > Lunge > Leber > Niere) (171, 175). Heparinoide besitzen eine hohe Verweildauer im RES, da sie im allgemeinen enzymatisch nur schwer abbaubar sind (80, 148, 171, 175). So fällt im Gegensatz zu Heparin bei wochenlang unverändertem Verteilungsmuster die ^{35}S -Aktivität im RES nur langsam ab (125).

Lineare Phosphatpolymere werden im Stoffwechsel von Ratten und Kaninchen zu Orthodiphosphaten hydrolysiert, während zyklische Polymere unverändert im Harn nachgewiesen werden können. Ca-Pyrophosphate werden von Makrophagen phagozytiert. Sekundär kommt es dabei zu einem Zusammenbruch der Lysosomen (145).

2.3.3.1.2. Nukleotidhaltige Polyanionen

RNA und RNA-ähnliche Polynukleotide werden nach parenteraler Gabe entsprechend ihrer RNase-Sensitivität zum größ-

ten Teil abgebaut. Der Rest verteilt sich auf Milz, Leber und Niere (39, 167).

Exogene DNA wird in der Blutbahn und im Interstitium nur in geringem Umfang von der Plasma-DNase angegriffen (76, 185), so daß ein Teil ohne wesentliche Veränderungen der makromolekularen Struktur von Zellen verschiedener Gewebe adsorbiert werden kann (108, 139). Hochmolekulare DNA verschwindet schneller aus der Blutbahn als niedermolekulare (107). Mit steigender Konzentration nimmt allerdings die Durchlässigkeit der Gefäßwand für DNA ab (185). An der Zelloberfläche wird die DNA an aktive Stellen gebunden (106). Am schnellsten erfolgt die Bindung an die Follikelzellen der Ovarien, an Vaginal- und Tumorzellen. Später sind exogene DNA bzw. DNA-Bestandteile in allen Organen und Geweben auffindbar, in denen sie nach Abbau für die DNA-Neusynthese wiederverwendet wurden (108) oder, v.a. in Organen mit hoher Proliferationsrate, zu 35 bis 40 % in Form makromolekularer Fragmente liegenblieben (175). Nur in der vaginalen Mukosa und in Mäuseembryonen ließen sich hinsichtlich MG und Schwimmdichte unveränderte DNA-Anteile nachweisen (108). In Ovarien und Vagina kann der Anteil exogener DNA 4 - 6 % des aktuellen DNA-Gehalts betragen (107). Die höchste Aufnahme rate für DNA, die die Plazentaschranke passieren kann, besitzen Embryonen zu Beginn der Embryogenese bis zum Funktionsbeginn der Organe (108).

2.3.3.2. Toxizität

Im Gegensatz zu schwer abbaubaren Polyanionen, wie Heparinoiden und RNasen-resistenten Polynukleotiden, besitzen Makromoleküle mit höherer Abbaurrate, wie native bzw. modifizierte Nukleinsäuren, RNase-sensitive Polynukleotide, Heparin oder Polyphosphate, keine bzw. nur eine in höheren Konzentrationen erkennbare Toxizität (39, 145).

Die akute Toxizität von Heparin und Heparinoiden ist gekennzeichnet durch anaphylaktoide Reaktionen sowie durch ent-

zündliche und degenerative Veränderungen besonders in Leber und Milz. Diese Veränderungen beruhen auf der zytotoxischen Wirkung vieler Heparinoide. Die im pathologisch-anatomischen Erscheinungsbild der Vergiftung auffallenden Hämorrhagien sind die Folge einer generalisierten Schädigung des Gefäßsystems und einer verminderten Gerinnungsfähigkeit des Blutes (80, 150, 173). So zeigt das Vergiftungsbild z. B. von PVS ($DL_{50/30d}$ bei der Maus von 72 bis 78 mg/kg Körpergewicht) innere Verblutungen mit Blutextravasaten in Brust- und Bauchhöhle sowie disseminierte Nekrobiosen mit entsprechenden bindegewebigen Reaktionen in der Leber (150, 173).

Als Auswirkung des antimittotischen Effektes manifestieren sich die toxischen Wirkungen bei chronischer Systemapplikation in Form von Alopezie, Ulzerationen des Magen- und Darmtrakts und Fingernagelveränderungen (80, 144, 145). Durch Hemmung des Knorpel- und Knochenwachstums kann es zu einer generalisierten Osteoporose mit multiplen Spontanfrakturen kommen. Zur Erklärung wurde an die Interferenz der sulfatierten Polyanionen mit der Matrixcalcifikation und/oder eine Blockade der Fibroblasten gedacht (145).

Die Toxizität von $Poly(rI) \cdot Poly(rC)$ ist starken spezies-spezifischen Schwankungen unterworfen, wobei Hunde und Rhesusaffen (die bei chronischer Applikation täglich maximal 1,0 mg/kg Körpergewicht vertragen) am empfindlichsten sind. Außerdem bestehen noch erhebliche Rassenunterschiede, so daß z. B. bei Mäusen verschiedener Stämme die $DL_{50/14d}$ in einem Bereich von 9,5 bis 34,7 mg/kg Körpergewicht liegen kann (2, 83). Bei den verschiedenen Spezies und Rassen gleichen sich jedoch qualitativ die Vergiftungserscheinungen. Sie betreffen zunächst das ZNS, wodurch es bereits während der Infusion bei erhaltenen Reflexen zur Depression des Sensoriums, später zu Schwäche, Ataxie, Tremor und (bei chronischer Applikation) zur Paralyse der Vorderextremität kommt (2, 39, 83). Stark ausgeprägt ist die Zerebellartoxizität beim Huhn, die durch Ödeme und Hämorrhagien aufgrund einer Zerstörung der Endothelien kleiner Blutgefäße bewirkt wird (38).

Bei akuter $Poly(rI) \cdot Poly(rC)$ -Vergiftung treten dar -

über hinaus anaphylaktoide Symptome auf, die dem Endotoxinschock gleichen, wie Temperaturanstieg, Leukopenie und Schwartzman-Sanarelli-Phänomen (2, 127). Bei vollständiger Gerinnungshemmung zeigen sich pathologisch-anatomisch Hämothorax, blutdurchtränkte Därme, Bauchblutungen und hämorrhagische Infarkte in Herz, Lunge, Leber und Niere (2, 83). Es entstehen Nekrosen in Leber, Knochenmark, Milz und anderen Organen, gefolgt von einem starken Anstieg verschiedener Serumenzyme (wie Transaminasen und Phosphatasen) (39, 83). Kurz vor dem Tod kommt es zu Erbrechen, Durchfall, verstärktem Tränenfluß, Temperaturabfall und schließlich v.a. über eine Stauungslunge zur Atmungsinsuffizienz (2, 83).

Bei chronischer Vergiftung entwickeln sich dosisabhängige Anämie, Lymphopenie, sowie Thymusatrophie und Milzhypoplasie mit gleichzeitiger Erhöhung verschiedener Serumenzyme (38, 83). Im Gegensatz zu Poly(rG)·Poly(rC) wirkt Poly(rI)·Poly(rC) stark embryotoxisch. Bei nur geringer teratogener Wirkung wurden Früchte von 8 bis 9 Tage trächtigen Kaninchen zu 100 % resorbiert (2).

In einer Reihe untersuchter Tierarten führte Poly(rI)·Poly(rC) nur beim Kaninchen zu toxischen Veränderungen an den Augen in Form von Linsentrübungen und Irishyperämie (38).

2.3.3.3. Systemwirkungen

2.3.3.3.1. Blut

2.3.3.3.1.1. Blutbild

Heparin, Heparinoide und andere nukleotidfreie Polyanionen, wie die Polymethacrylsäure, bewirken durch Stimulation der hämopoetischen Stammzellen eine vorwiegend lymphozytäre Leukozytose, weshalb Verbindungen dieser Art auch als "LMC" (lymphocyte mobilizing compounds) bezeichnet werden. Die neutrophilen Granulozyten werden nur geringfügig er-

hört, während die eosinophilen Granulozyten, Erythrozyten und Thrombozyten unverändert bleiben (11, 62, 152). Die Wirkung tritt bei Verabreichung von sulfatierten Kohlenwasserstoffen mit mehr als 2 Zuckeranteilen ein, ist im Umfang jedoch vom MG und Veresterungsgrad abhängig (152).

Poly(rI)·Poly(rC) führt hingegen durch Hemmung der hämopoetischen Stammzellen zu einem zeitweisen Abfall von Leukozyten und Retikulozyten im peripheren Blut. So verringern sich bei chronischer Applikation der Verbindung die Hämatokrit- und Hämoglobinkwerte aufgrund einer sich entwickelnden Anämie (2).

2.3.3.3.1.2. Serumenzyme

Heparin und einige Heparinoide (z. B. SP₅₄) bewirken die Klärung von lipämischem Plasma durch Freisetzung eines Klärfaktors, einer Lipoproteidlipase, und beschleunigen die intravasale Lipolyse durch Aktivierung lipolytischer Enzyme, so des Glycerinesterhydrolase-Systems (12, 114). Dadurch kommt es zur Auflösung von Chylomikronen und durch Lipolyse zu einem Anstieg freier Fettsäuren, zu einer Herabsetzung der Oberflächenspannung im Plasma sowie zu qualitativen und quantitativen Veränderungen der Plasmalipoproteide (113, 114).

Unter Polyanionenwirkung treten im Serum vermehrt lysosomale Enzyme auf (113, 114). Hohe Poly(rI)·Poly(rC)-Dosen erhöhen im Serum die Aktivitäten verschiedener Transaminasen, der LDH und der alkalischen Phosphatase (2).

Polyanionen (z. B. Polyacrylsäure) bewirken im Serum neben einer Veränderung der Enzymaktivitäten auch eine Zunahme der γ -Globulinfraktion des Plasmaeiweißes (47).

2.3.3.3.1.3. Gerinnung

In Abhängigkeit von MG, Sulfurierungsgrad und Bindungsart des Schwefels hemmen Heparin und Heparinoide die Blutgerinnung (79, 130).

Heparin, von dem nur die α -Fraktion wirksam ist, greift dabei an 4 Stellen in das Gerinnungssystem ein:

1. durch Bildung eines inaktiven Komplexes mit Faktor XI (PTA-Faktor) wird Faktor IX (Christmas-Faktor) gehemmt (130).
2. die Antithromboplastin-Wirkung des Heparins verhindert die Umwandlung von Prothrombin in Thrombin durch Inaktivierung des Thromboplastins (64, 104, 130).
3. Heparin unterbindet die Bildung von Fibrin aus Fibrinogen durch beschleunigte Bildung einer inaktivierten Thrombin-Antithrombin-Verbindung (64, 104, 130).
4. Hemmung der Agglutination und Retraktion von Thrombozyten (104).

Neben dieser antikoagulativen besitzt Heparin auch noch fibrinolytische Aktivität, indem es die Fibrinolyse wahrscheinlich über eine Plasminogenaktivierung beschleunigt (12, 104, 130, 145).

Heparinoide sind mehr oder weniger stark wirksame Antikoagulantien, die jedoch mit zeitlich verschobenem Wirkungseintritt eine geringere Aktivität als Heparin aufweisen. Der Mechanismus der Gerinnungshemmung läuft wahrscheinlich über eine Assoziation des Heparinoids mit einem im Plasma und Serum vorhandenen Heparin-Cofaktor ab. Dadurch wird endogen an ein Trägerprotein gebundenes Nativheparin mobilisiert, das nun seinerseits an den entsprechenden Stellen im Gerinnungssystem angreift ("Heparin releasing effect") (79, 130).

Poly(rI)·Poly(rC) bewirkt v. a. bei Hunden in hohen, letalen Dosen bei nicht mehr feststellbarer Prothrombinaktivität eine vollständige Gerinnungshemmung (2).

2.3.3.3.2. Enzyme

Heparin und Heparinoide bewirken sekundär über die Freisetzung lipolytischer Enzyme ein Aufbrechen zellulärer und lysosomaler Strukturen. Dadurch kommt es zu einem Anstieg saurer Hydrolasen im Plasma (114):

Im Rattenplasma treten nach Heparin vermehrt die saure RNase, β -Glukuronidase, saure β -Glycerophosphatase sowie die Eserin-resistente und -sensitive Tributyrinesterase auf, während Kathepsin und Benzoyl-arginin-äthyl-esterase unverändert bleiben (114, 115). Beim Hund liegen die Eserin-resistente Tributyrinesterase und die Lipoproteidlipase im Plasma als Heparin-Proteinkomplex vor, wobei der Proteinanteil wahrscheinlich aus der Gefäßwand stammt. Auch das schnelle Auftreten von saurer RNase und Tributyrinesterase nach der Heparininjektion spricht für eine Freisetzung der Enzyme aus Intima- und Adventitiazellen (114).

Ebenso ist der 4- bis 10fache Anstieg von GOT, GPT, LDH und alkalischer Phosphatase im Serum nach hohen, letalen Poly(rI)·Poly(rC)-Dosen Ausdruck umfangreicher Zellzerstörungen (2).

Heparinoide können in Abhängigkeit von ihrer Konzentration hemmende und/oder fördernde Einflüsse auf die In vivo-Aktivität lysosomaler Enzyme ausüben. In hohen und nach längerer Wirkungsdauer auch in niedrigeren Konzentrationen erhöht z. B. PVS die Aktivität der alkalischen und sauren p-Nitrophenyl-Phosphatase in Lunge, Thymus, Leber, Milz und Niere und der DNase II in Leber und Milz. Diese Aktivitätsänderungen wurden als Ausdruck faßbarer histiolytischer und reparativer Vorgänge gedeutet (170). In niedrigeren Dosen hemmt PVS zumindest anfangs (solange noch keine histiolytischen Vorgänge ablaufen) Phosphatasen und DNasen sowie andere Enzymsysteme (s.u. 2.3.1.4.). (Die Mechanismen sind weitgehend unspezifisch (171, 173, 175).)

2.3.3.3.3. Hormone

Heparin und Heparinoide bewirken über Stimulierung der Nebennierenrinde (NNR) nach 7 bis 10 Tagen einen Anstieg der Steroide im Harn (Heparin verhindert die NNR-Atrophie nach Cortison) (68). Gleichzeitig interferieren diese Polyanionen mit den NNR-Hormonen.

Durch die Blockade von Renin und Angiotensin hemmen Polyanionen in Abhängigkeit vom Sulfatgehalt die Aldosteronproduktion und besitzen so natriuretische Aktivität. Durch gleichzeitige Überlagerung mit Adiuretin kommt es zu einer unspezifischen Stimulierung der gesamten renalen Ausscheidung (118, 145).

Durch Hemmung der Reduktion des C-Rings von NNR-Steroiden in Rattenleberhomogenaten verändert Heparin den Cortisolmetabolismus und verhindert dadurch die Cortison-induzierte Nephropathie beim Kaninchen sowie Lympho- und Eosinopenie (Lympho- und Eosinopenie werden durch Mobilisierung der eosinophilen Granulozyten aus den Depots und/oder Blockade des RES mit verzögerter Eliminierung der Leukozyten aus dem Blutkreislauf verhindert) (68, 145).

ACTH wird in vivo an Heparin gebunden, wodurch sich die Sensibilität gegenüber der toxischen Wirkung basischer Stoffe erhöht und Heparin antagonistisch zum ACTH den Glukose- und Brenztraubensäurespiegel beeinflusst (68, 145).

Einige Polyanionen, z. B. Suramin, ein polyanionisches Sulfonat, können aber auch NNR-Atrophie (Entwicklung von Addison-Symptomen und Nekrosen in der Zona fasciculata) bewirken (145).

Heparin kann mit Insulin Komplexe bilden und Melatonin inaktivieren (145).

2.3.3.3.4. Immunsystem

Während sulfathaltige Polyanionen in vitro die Antikörpersynthese um 60 bis 98 % hemmen (182), werden in vivo unter Polyanionen-

wirkung die zelluläre und v. a. die humorale Abwehr mobilisiert (46, 51, 56, 91, 142). So stimulieren Heparinoide und andere nukleotidfreie Polyanionen das RES (145) - in das sie nach ihrer Verabreichung schnell eingelagert werden (s.u. 2.3.3.1.1.). Die Aktivierung hämopoetischer Stammzellen führt zu einer starken, überwiegend lymphozytären Leukozytose (2.3.3.3.1.1.). Durch die Zunahme der B- und T-Zellen ^{*)} (und damit auch der Erinnerungszellen nach Aktivierung der DNA-Synthese) sowie der Makrophagen und der Antikörper-bildenden Zellen in der Milz kommt es in immunisierten Tieren unter verstärkter RNA-Synthese zu einer Steigerung der Antikörperbildung. Sie umfaßt sowohl 19 S- als auch 7 S-Antikörper und führt aufgrund der dadurch vermehrten Anzahl an zirkulierenden Antikörpern zu einem Anstieg des γ -Globulinspiegels im Blut (46 - 51, 91).

Diese Wirkung auf alle Antikörper-bildenden Zellen besitzen auch doppelsträngige Nukleotide, obwohl diese teilweise Elemente des RES, wie die Kupffer'schen Sternzellen, nicht betreffen (127) und außerdem eine vorübergehende 60 bis 80 %ige Abnahme hämopoetischer Stammzellen (evtl. durch Hemmung des Zellzyklus beim Übergang von der G 1- zur S- und G 2-Phase) bewirken (93). Deutliche Wirkung zeigen niedermolekulare DNA, RNA (die in biologischen Systemen auch an der immunologischen Informationsübertragung auf Antikörper-bildende Zellen beteiligt ist) sowie Poly(rA)·Poly(rU) und Poly(rI)·Poly(rC) (46, 47, 91, 92).

Der Umfang der Stimulation der Antikörpersynthese hängt stark von der Struktur des Polyanions ab. Polyanionische Makromoleküle sind umso wirksamer, je schwerer sie enzymatisch abbaubar sind. Leicht abbaubare einsträngige Polynukleotide sind daher wirkungslos und Polynukleotide im allgemeinen weniger wirksam als die meisten

*) B - Z e l l e n : "Bursaäquivalent-abhängige" Lymphozyten des Antikörperbildungssystems, die ihre Wirkung über sezernierte Antikörper entfalten.

T - Z e l l e n : Thymusabhängige Lymphozyten des Selbsterkennungssystems, die entweder in direktem Antigenkontakt oder durch Makrophagenaktivierung Fremdantigentragende Zellen zerstören und Helferzellfunktion besitzen.
(73)

nukleotidfreien Polyanionen (39, 48). Von Einfluß sind außerdem noch die Ladungsverhältnisse; z. B. besitzt das negativ geladene Dextran-sulfat stark stimulierende Wirkung, Dextran hingegen keine, positiv geladenes DEAE-Dextran sogar hemmende Wirkung. Ohne Bedeutung ist dagegen das Molekulargewicht: SP_{54} ist schon ab 10 Zuckereinheiten mit je 2 Schwefelsäureresten wirksam, wobei es in der Größenordnung mit Oligonukleotiden vergleichbar ist (48).

Während Polyanionen in nicht-immunisierten Tieren nur die Proliferationsrate von zur Antikörperbildung befähigten Zellen und die Differenzierung von "Erinnerungszellen" anregen (46, 47), beschleunigen und erhöhen sie in immunisierten Tieren (z. B. mit Schaeferythrozyten immunisierten Mäusen) darüber hinaus die Immunantwort bis auf das 260fache (durch Polyacrylsäure) (46 - 51). Hierbei wirken Polynukleotide lediglich auf die erste, durch 19 S-Antikörper gekennzeichnete Immunantwort. Stark dissoziierende, nukleotidfreie Polyanionen, wie Dextransulfat, Polyacrylsäure, Pyran-Copolymer, intensivieren auch die zweite Immunantwort, die unter überwiegender Freisetzung von 7 S-Antikörpern abläuft (47, 50, 51). Der Mechanismus dieser Stimulation besteht in einer Beeinflussung der B-Zellen durch die Polyanionen über den Weg der Helferzellen (T-Zellen und/oder Makrophagen) am Anfang der Immunreaktion ohne direkten Kontakt mit dem Antigen (48 mit 50). Die Polyanionen ersetzen dabei wahrscheinlich einen unspezifischen Induktor und/oder Repressor von polyanionischer Struktur. Ein solcher Effektor wird durch das Antigen aus den Helferzellen freigesetzt, dringt in immunkompetente B-Zellen, die durch den Antigenkontakt für Polyanionen permeabel wurden, ein und löst dort eine Enthemmung ähnlich der Interferoninduktion aus (46). Die Frage, ob dieser polyanionische Faktor aus T-Zellen freigesetzt wird und/oder aus einem bestimmten, durch T-Zellen aktivier- und induzierbaren Knochenmarkszelltyp stammt, konnte bislang nicht ausreichend beantwortet werden (49).

Für die Fähigkeit von Polyanionen, in immuntoleranten oder T-Zellen-freien Mäusen (nach Thymektomie oder tödlicher Strahlendosis) ohne T-Zellenzusatz die T-Zellenfunktion zu ersetzen und/oder wiederherzustellen, werden drei mögliche Wege diskutiert (49):

1. Polyanionen ersetzen den von den T-Zellen freigesetzten polyanionischen Induktor bzw. Repressor.
2. Polyanionen ersetzen den aus einem bestimmten Knochenmarkszelltyp nach Induktion durch T-Zellen freigesetzten polyanionischen Faktor.
3. Polyanionen induzieren die Differenzierung und/oder Proliferation eines Knochenmarkszelltyps, der die Helferzellenfunktion der T-Zellen ersetzen kann.

Für den Wirkungsmechanismus einer Substitution des polyanionischen Effektors sprechen die geringe bzw. fehlende Wirkung von Polyanionen bei genetisch starken Immunreagenten (die selbst viel Induktor bilden können), der geringe Reaktionsumfang nach hohen Antigendosen (die vermehrte Freisetzung von Induktormolekülen bewirken) und die Verringerung der Immunantwort mit steigenden Polyanionendosen (46, 47).

Bestehende Immunsuppression (z. B. nach Antilymphozytenserum) kann durch Poly(rI)·Poly(rC), das in den meisten Systemen die Immunantwort erhöht, allerdings nicht aufgehoben werden (103).

Durch derartige Stimulierung des Immunsystems sind Polyanionen in der Lage, die Wirtsresistenz gegenüber verschiedenen antigenen Faktoren, so auch gegenüber der Vermehrung von Bakterien- und Tumorzellen, zu erhöhen (145). Die Zunahme der Resistenz verschiedener biologischer Systeme gegenüber Virusinfektionen läuft nicht über die o.e. Reaktionsmechanismen ab, sondern entwickelt sich auf der Basis der Interferoninduktion (s.u. 2.3.2.3.) (27).

Polyanionen können aber auch überschießende allergische Reaktionen eindämmen und besitzen so bei verschiedenen allergischen Erkrankungen (wie z. B. bei allergischem Asthma, Lupus erythematoses, herpetiformer Dermatitis, allergischen Ekzemen, allergischer Thrombozytopenie, hämolytischer Anämie, rheumatoider Arthritis, kutanen allergischen Reaktionen und bei allergisch bedingter Fibroblastenproliferation im Auge) im System und lokal antiphlogistische Eigenschaften.

ten. Diese Entzündungshemmung ist sowohl die Folge der Wechselwirkung zwischen Polyanionen und Proteinen (Verschiebung des IEP, Veränderung der Antigen-Antikörper- und Komplementaktivität), als auch durch lokale Degranulation von Mastzellen in den Lymphknoten unter der Wirkung von Heparin und Heparinoiden bedingt. Dadurch wird vermehrt endogenes Heparin freigesetzt, das Histamin binden kann, Antiserotoninaktivität besitzt (145) und den Blutspiegel lysosomaler Enzyme weiter erhöht. Lysosomale Hydrolasen können als wichtige Bestandteile physiologischer Repair- und Abbauprozesse die antiphlogistische Wirkung unterstützen (113).

Die entgiftende Wirkung von Heparin gegenüber Endotoxinen beruht nicht auf Wechselwirkung mit dem Immunsystem, sondern auf den gerinnungshemmenden und fibrinolytischen Eigenschaften des Poly-anions. Auf diese Weise kann das generalisierte Sanarelli-Shwartzman-Syndrom verhindert werden ^{*)} (41).

2.3.3.3.5. Tumorstadium

Polyanionen können in vivo die Proliferationsrate von normalen, schnellwachsenden Zellen verringern. So hemmt Poly(rl)·Poly(rc) in ausreichenden Dosen das Organwachstum in jungen Ratten, die zelluläre Proliferation der regenerierenden Leber nach Teilhepatektomie und die durch Isoproterenol stimulierte Proliferation der Speicheldrüsenzellen (103). Unter PVS-Wirkung nehmen Mitoseindex und Zellwanderung in normalen Organexplantaten (151) und die Mitoserate der regenerierenden Niere nach Schädigung durch Folsäure ab (81).

Hinsichtlich der Mechanismen der Mitosehemmung durch Polyanionen in vitro (Zellkulturen s.u. 2.3.2.2.) und in vivo bestehen Analogien. Polyanionen wirken zytotoxisch und interferieren mit

*) Das generalisierte Sanarelli-Shwartzman-Syndrom ist gekennzeichnet durch diffuse intravasale Gerinnung mit ausgedehnten Fibrinablagerungen bis hin zur Afibrinogenämie und dadurch bedingten bilateralen Nierenrindennekrosen, die zu akutem Nierenversagen führen (41).

Translationsvorgängen (81) und der DNA-Synthese. Da sich der Einfluß von Polyanionen besonders im Anfangsstadium der Zellteilung (z. B. von Isoproterenol-stimulierten Speicheldrüsen (25) und hyperplastischen Epidermiszellen) bemerkbar macht, verlängert sich die Latenzzeit für die Vermehrung dieser Zellen (56).

Heparin wird in verschiedenen biologischen Systemen von unterschiedlicher Organisations- und Entwicklungshöhe die Rolle eines physiologischen Mitosehemmers zugesprochen, der (besonders in Geweben mit hoher und geregelter Mitoserate - Ovarien, embryonale Gewebe, z.B. im Prägastrulationsstadium von Seeigelembryonen) durch direkten Eingriff in die Genregulation eine Sicherung gegen vorzeitige Teilung bewirken könnte (69, 153, 163).

Entsprechend ihren antimitotischen Eigenschaften zeigen Polyanionen verschiedener Struktur deutliche Hemmeffekte gegenüber tierischen und menschlichen Tumoren, einschließlich chemisch-induzierten Tumoren und einigen Leukämieformen (2, 11, 56, 62, 66, 69, 74, 92, 93, 110 - 112, 117, 133, 145, 151). *) Einige Polyanionen fanden als Zytostatika Eingang in die Therapie. Dazu gehören Poly(rI)·Poly(rC) (93) oder die Apurinsäure, die speziell bei Kolontumoren Anwendung fand (74). Ihr Einsatz blieb aufgrund starker Nebenwirkungen bisher allerdings beschränkt.

In Abhängigkeit von einigen Strukturmerkmalen, wie niedrigem Molekulargewicht (bessere Permeabilität) und Doppelsträngigkeit bei Polynukleotiden zeigt sich der Einfluß auf Tumor und Tumorträger in folgenden Veränderungen:

1. Abnahme des Mitoseindex (69, 151).
2. 40 bis 50 %ige Rückbildung des Tumorumfanges (69, 110).
3. Reifungshemmung (69).
4. Verringerung der Transplantationsrate bis zu 90 % (69).

*) Die antileukämische Wirkung wird anfänglich durch die Polyanionen-bedingte Lymphozytenmobilisation überlagert, die sowohl normale wie maligne Zellen der Lymphoidreihe mobilisiert (136).

5. Verhinderung der intraperitonealen Transplantierbarkeit (69).
6. Verlängerung der Latenzzeit (56).
7. Beeinflussung des Verteilungsmusters bzw. Verhinderung von Tumormetastasen mit verminderter Zahl an zirkulierenden Tumorzellen (11, 62, 69, 133, 151).
8. Verlängerung der Überlebenszeit des Tumorträgers (Tab. 8) (56, 69, 93, 110).

Tab. 8: Überlebensrate von tumortragenden Mäusen nach 3maliger i. p. Applikation von 150 bis 200 µg Poly(rI)·Poly(rC)/Maus und Woche. Durchschnittliche Überlebenszeit über die Kontrollen in % (nach 110).

Tumor	Überlebensrate
J 96132 Retikulumzellsarkom (subkutan)	130
J 96132 Retikulumzellsarkom (Aszites)	96
Carcinosarkom Walker 256	100
Retikulumzellsarkom	89
Ehrlich-Aszites-Tumor	70
S 91 Melanom	55
Fibrosarkom	52
B 1237 Lymphom (Aszites)	45
L 1210 Leukämie	42
B 1237 Lymphom (subkutan)	28
Mt-1 Tumor (subkutan)	26
Ovarielles Retikulumzellsarkom	20
Leukämie P 388	16
Leukämie K 1964	12

Die carcinostatische Wirkung von Polyanionen wird v. a. in der Promotionsphase, weniger in der Initiationsphase des Tumorwachstums deutlich (56). Von den in Frage kommenden Mechanismen (die sich überlagern können), stehen drei im Vordergrund:

1. Eingriff in die Makromolekülsynthese (103, 110, 111).
2. Steigerung der Immunantwort (56, 62, 93, 110).
3. Interferoninduktion (56, 62, 93, 110, 117, 179).

Makromolekülsynthese:

Polyanionen besitzen eine direkte und selektive chemotherapeutische Wirkung, indem sie in unterschiedlichem Umfang in den Makromolekülstoffwechsel der Zelle auf verschiedenen Ebenen eingreifen (s.u. 2.3.2.2.). In vivo unterliegt die Beeinflussung einzelner Reaktionsabläufe durch Polyanionen allerdings starken spezies- und stammspezifischen Unterschieden, wie sich schon aus der Hemmung der Proteinsynthese bei verschiedenen Mäusestämmen durch Poly(rI)·Poly(rC) ergibt: Balb C-Mäuse > CDF₁-Mäuse > C 57 black Kaplan-Mäuse (111).

Immunsystem:

Die antitumoröse Wirkung von Polyanionen über das Immunsystem ist neben teilweise starker Lymphozytenimmigration (z. B. nach Polymethacrylsäure) und Zunahme der Antikörpersynthese durch eine höhere Empfindlichkeit der Tumorzellen gegenüber Antikörpern gekennzeichnet (62, 111). Poly(rI)·Poly(rC) hemmt das Tumorstadium jedoch auch nach Immunsuppression ohne Steigerung der Immunantwort, so daß nach entsprechenden Dosen histologisch im Tumorgewebe ausgedehnte Nekrosen bei nur geringer Lymphozytenimmigration zu erkennen sind (103, 142).

Interferoninduktion:

Polyanionen hemmen über Interferoninduktion die Vermehrung onkogener Viren (s.u. 2.3.2.3.) sowie die durch diese Viren bedingte zelluläre Transformation und Tumorentwicklung (93, 117). Die virostatistische Wirkung wird durch eine gleichzeitige Aktivitätsverminde-

rung der Umkehrtranskriptase unterstützt (117). Die Tumorinduktion durch Polyomaviren kann allerdings nur bei gleichzeitiger Steigerung der Immunantwort unterbunden werden, während bei Adenoviren eine Erhöhung des Interferonspiegels allein ausreicht (179). Durch Interferon wird aber nicht nur das Wachstum von virusinduzierten, sondern auch von spontanen, transplantierten und strahleninduzierten Tumoren gehemmt (56).

Einige weitere Eigenschaften von Polyanionen, welche diese Substanzen als zur Tumorbeflussung geeignet erscheinen lassen, seien noch kurz aufgeführt:

Zytotoxische Wirkungen:

Die Erhöhung der Membranpermeabilität (als ein Ausdruck allgemeiner zytotoxischer Wirkung) (s.u. 2.3.2.2.) führt zu einer Verringerung der Blut-Tumor- bzw. Blut-Hirn-Schranke und damit zu einem erleichterten Eintritt von Chemotherapeutika (145).

Verteilungsmuster von Metastasen:

Durch direkten Angriff der Polyanionen an der Oberfläche von Tumorzellen wird das Verteilungsmuster von Metastasen beeinflusst (133).

Wirkung auf den nutritiven Status des Tumorgewebes:

Tumorgewebe verwertet in hohem Umfang ganze Proteinmoleküle. Wechselwirkung zwischen Proteinen und Polyanionen, Hemmung (infolge IEP-Verschiebung) proteolytischer Enzyme (sie machen Wirtspolypeptid für den Tumor verwendbar) und Stimulierung des RES (das Fibrin-Clearance-Wirkung besitzt) können zur Verringerung des für die Tumornahrung notwendigen Proteinangebots führen (145).

Speziell Heparin kann durch seine fibrinolytischen Eigenschaften den

Fibrinwall um Tumoren abbauen, der nutritive Aufgaben erfüllt und die Tumorzellen vor Antikörperangriff schützt (123). So befinden sich besonders in der Peripherie, aber auch im Parenchym humaner Spontantumoren große Mengen an Mastzellen, deren Anzahl sich umgekehrt proportional zur Zahl der Tumorzellmitosen verhält. Mit dieser Abwehrreaktion bewirkt der Körper eine erhöhte lokale Freisetzung von endogenem Heparin, das hemmende Einflüsse auf die Tumorentwicklung ausüben kann (69).

Fällung von Proteinen:

Besonders die Fällung von Thrombin und Fibrinogen führt durch Arteriolenverstopfung zu Kreislaufänderungen mit nachfolgender Anoxie im Tumorgewebe (145).

Bildung von Nonsenseproteinen:

Poly(rI)·Poly(rC), das ein Prolinpolypeptid codieren kann, stimuliert durch derartige Nonsenseproteine zelluläre Reaktionen (112).

Hyaluronidasehemmung:

Durch IEP-abhängige Hemmung der Hyaluronidase-Aktivität vermindern Polyanionen das invasive Wachstum von Tumoren (69).

Beeinflussung des zyklischen 3', 5'-Adenosinmonophosphats (cAMP) (v. a. durch synthetische Polynukleotide) (56). *)

*) cAMP besitzt Regulationsaufgaben in der Replikation, Transkription und Translation (pp. 178, 192 und 198 in 20) in seiner Funktion als "2. Bote" bei der intrazellulären Realisation verschiedener Hormonwirkungen (p. 220 in 20) und durch Wechselwirkung mit Histonen (p. 192 in 20).

2.3.3.3.6. Strahlenschutz

Nukleinsäuren, Nukleinsäurehydrolysate und Nukleoside fördern in bestrahlten biologischen Systemen unterschiedlicher Entwicklungs- und Organisationshöhe die Regeneration und steigern die Überlebenszeit bis auf das 4fache (7, 75, 94, 115, 128, 138, 140, 149, 176).

Der restaurative Effekt dieser Verbindungen läuft auf makromolekularer Ebene möglicherweise in Form einer Kombination genetischer und metabolischer Wirkungen ab (94, 140) und führt zu Verminderung des DNA-Abbaus (176) sowie zu rascherer Erholung der strahlengeschädigten DNA-Synthese (75, 128) und einiger sie steuernder Enzymsysteme, wie DNA-Polymerase und Aspartat-Carbamyl-Transferase (128).

Als Mechanismen werden

- Ersatz geschädigter Nukleinsäuresequenzen,
- Neutralisierung freigesetzter Nukleasen,
- Reaktionen der polyanionischen Nukleinsäuren mit Histonen,
- Substitution von Nukleinsäurevorstufen,
- Aktivierung der RNA- und Proteinsynthese (128, 138) und
- Förderung der postreplikativen DNA-Synthese (die durch Desoxyribonukleosid-Gemische - hauptsächlich durch Puringemische - auf das 1,5fache erhöht wird) (140) diskutiert.

Je näher die genetische Verwandtschaft und je größer die Nativität der verwendeten DNA sind, umso höher sind die Aussichten für einen umfangreichen Repair-Effekt. So bleibt heterologe DNA im Gegensatz zu homologer über längere Zeit intrazellulär in Form makromolekularer Fragmente liegen und zeigt erst nach vollständigem Abbau und Übergang in die De novo-DNA-Synthese der strahlengeschädigten Zelle restaurative Wirkung (164). In Bakterienkulturen sind nur homologe, hochpolymere Nukleinsäuren wirksam im Gegensatz zu Säuger- und Pflanzenzellen, die auch heterologe und Nukleasen-abgebaute Nukleinsäuren verwenden können (7, 140).

Die Strahlenschutzwirkung Hydroxylgruppen-tragender Nukleinsäure-

basen könnte auf dem anabolen Wirkungsprinzip dieser Verbindungen (Hemmung der Flavinenzyme) (143) beruhen.

Die Verringerung von Strahlenschäden durch Heparin-gaben ist in ihrem Mechanismus bislang ungeklärt (26, 69).

3. MATERIAL UND METHODIK

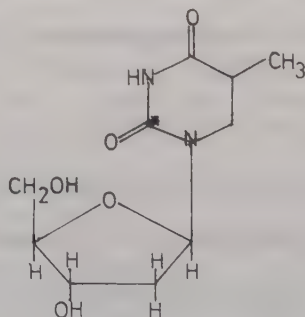
3.1. Reagentien und Tiermaterial

3.1.1. Reagentien

1. Äthanol 96 %ig, mit Petroläther vergällt,
HEMMETER, München
2. Albumin aus Eiern, RIEDEL-DE HAEN AG, Nr. 1337
3. p-Aminophenol (4-Aminophenol), zur Synthese, MERCK, Nr. 421
4. n-Amylalkohol, p.a., MERCK, Nr. 975
5. Anilin, p.a., MERCK, Nr. 1261
6. Calciumchlorid, geschmolzen, hirsekorngroß, zur Elementaranalyse, MERCK, Nr. 2083
7. Chloroform, DAB 7, MERCK, Nr. 2431
8. Collagenase (Clostridiopeptidase A, E. C. 3.4.24.3.) aus Clost. histolyticum, lyophilisiert, 0,15 U/mg, BOEHRINGER, Nr. 15412
9. Desoxyribonukleinsäure (DNA), hochmolekular, Na-Salz, aus Kalbsthymus, mind. 95 % DNA, Molekulargewicht 8 900000, N ca. 14,5 %, P ca. 8 %, EGA-CHEMIE, Steinheim, Nr. 16820 -3
10. Diäthyläther, MERCK, Nr. 926
11. Diphenylamin, p.a., MERCK, Nr. 3086
12. Eisen(III)-chlorid, p.a., MERCK, Nr. 3943
13. Essigsäure 100 % (D etwa 1,05), Eisessig, p.a., MERCK, Nr. 90063
14. D(+)-Glukose (Monohydrat), für biochemische Zwecke, MERCK, Nr. 8342

15. Glukose-6-Phosphat, Di-Na-Salz, BOEHRINGER, Nr. 15307
16. Hefe-Nukleinsäure, Trockensubstanz, N 15,3 %, P 8,7 %, SCHUCHARDT, München, Nr. NU 087
17. Hyaluronidase (Hyaluronat 4-glycanohydrolase, E.C. 3.2.1.35) aus Schafshoden, lyophilisiert, salzfrei, ca. 100 E/mg Lyophilisat, BOEHRINGER, Nr. 15005
18. Kaliumacetat, reinst, MERCK, Nr. 4820
19. Kaliumchlorid, p.a., MERCK, Nr. 4936
20. Kaliumdihydrogenphosphat, krist., reinst, MERCK, Nr. 4871
21. Kaliumjodid, p.a., MERCK, Nr. 5053
22. Kaliumnatriumtartrat, Seignettesalz, p.a., MERCK, Nr. 8087
23. Kupfer(II)-sulfat, $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, p.a., MERCK, Nr. 2790
24. Magnesiumchlorid, $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, p.a., MERCK, Nr. 5833
25. Magnesiumsulfat, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, p.a., MERCK, Nr. 5886
26. Natriumacetat, wasserfrei, p.a., MERCK, Nr. 6268
27. Natriumhydrogencarbonat (natrium bicarbonicum), MERCK, Nr. 6329
28. Natriumchlorid, krist., p.a., MERCK, Nr. 6404
29. di-Natriumhydrogenphosphat-2hydrat, p.a., MERCK, Nr. 6580
30. Natronlauge 0,1 N, Titrisol[®], MERCK, Nr. 9959
31. Nicotinamid-adenin-dinucleotidphosphat, di-Na-Salz, BOEHRINGER, Nr. 15600
32. Nicotinsäureamid für biochem. Zwecke, MERCK, Nr. 6818
33. Orcin-monohydrat, reinst, SERVA, Nr. 31180

34. Phenol, chemisch rein, DAB 6, RIEDEL-DE HAEN AG, Nr. 16016
35. L-Phenylalanin-U-¹⁴C, C₆H₅C^{*}H₂C^{*}H(NH₂)C^{*}OOH
(* = "heiße" Atome), > 380 mCi/mmol, in 0,5 ml
1 N HCl gelöst, NEN-CHEMICALS GmbH, Dreieichenhain,
Nr. NEC-284
36. Polyinosinsäure-Polycytidylsäure (Poly(rI)·Poly(rC)), Doppel-
strang, Na-Salz, lyophilisiert, reinst, salzfrei, freie Nukleotide
0,02 %, Nukleinsäuren und Nukleoside nicht nachweisbar,
S_{2Ow} >12, SERVA, Nr. 33190
37. Polyvinylsulfat (PVS), K-Salz, rein, SERVA, Nr. 33426
38. Saccharose, reinst, krist., rechtsdrehend in Wasser, Rohrzuk-
ker, SCHUCHARDT, Nr. SU 142
39. Salzsäure rauchend, mind. 37 % (D etwa 1,19), p. a., MERCK,
Nr. 317
40. Salzsäure 0,1 N, Titrisol[®], MERCK, Nr. 9972
41. Schwefelsäure 95 - 97 % (D etwa 1,84), p. a., MERCK Nr. 731
42. Thymidin-2-¹⁴C
>380 mCi/mmol,
0,5 ml sterile, wäß-
rige Lösung, NEN-
CHEMICALS GmbH,
Nr. NEC 156
(* = heißes Atom)
43. Trichloressigsäure,
p. a., MERCK, Nr. 807
44. Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan (TRIS), Puffersubstanz,
MERCK, Nr. 8382
45. Trypanblau, pro injectione, MERCK, Nr. 1292



3.1.2. Tiermaterial

Die Untersuchungen erfolgten an ca. 650 weiblichen NMRI-Mäusen aus institutseigener, konventionell gehaltener Zucht und an ca. 200 weiblichen NMRI-Mäusen aus einer spf -Zucht der Fa. WIGA (Versuchstierzuchtanstalt Willi Gaßner, Sulzfeld) mit einem Durchschnittsgewicht von 22 ± 3 Gramm.

3.1.3. Haltung und Fütterung der Versuchstiere

Die Mäuse wurden in Makrolonkäfigen nach FISCHER und GÖNNERT (37 x 21 x 15 cm) bei 23^o C gehalten und erhielten vor und während der Versuche Wasser und ALTROMIN[®] -Preßfutter (Altrogge Kraftfutter GmbH, Lage/Lippe) ad libitum. Die Größe der Versuchsgruppen betrug 5 bis 8 Tiere.

3.1.4. Behandlung der Tiere

3.1.4.1. Lösungen

1. Physiologische Kochsalzlösung: 0,14 mol NaCl wurden in 1 l dest. Wasser gelöst.
2. PVS und Poly(rI)·Poly(rC) wurden entsprechend den Dosierungen in physiologischer Kochsalzlösung gelöst. Dabei wurde die Konzentration so gewählt, daß 0,01 ml der Lösung die Dosis für 1 g Körpergewicht (K.gew.) der Versuchstiere enthielt. Die Lösungen wurden vor der Injektion frisch hergestellt.
3. DNA-Lösung: Die DNA wurde in dest. Wasser durch ca. 3stündiges automatisches Rühren (Laborrührer Typ RZR, Fa. HEIDOLPH, Schwabach) mit 1800 U/min zu 0,56 μ mol/l gelöst und in Portionen von 0,5 ml bis zum Verbrauch bei - 15^o C aufbewahrt. Vor Gebrauch wurde die Lösung langsam aufgetaut. Davon erhielten die Tiere je nach Dosierung pro g K.gew. 0,02 bzw. 0,01 ml, bzw.

nach Weiterverdünnung im Verhältnis 1 : 2 0,01 ml verabreicht.

4. Phenylalanin-U- ^{14}C mit einer Aktivität von 50 μCi wurden in 25 ml physiologischer Kochsalzlösung aufgenommen und im Kühlschrank aufbewahrt. Von dieser Lösung erhielten die Versuchstiere pro g K.gew. 0,02 ml entsprechend einer Aktivität von 0,04 μCi .
5. Von Thymidin- 2- ^{14}C wurde eine Menge entsprechend einer Aktivität von 50 μCi mit 25 ml physiologischer Kochsalzlösung vermengt und im Kühlschrank aufbewahrt. Diese Lösung wurde vor der Injektion im Verhältnis 1 : 2 weiterverdünnt. Davon wurde den Tieren pro g K.gew. 0,01 ml mit einer Aktivität von 0,01 μCi appliziert.

3.1.4.2. Behandlung der Tiere zur Bestimmung der Reaktionsmaxima

3.1.4.2.1. Einmalige Applikation

Den Versuchstieren wurden gruppenweise 12,5 15, 50, 75 mg PVS, 25, 50, 100 mg DNA, oder 0,25, 0,50 bzw. 1,0 mg Poly(rI)·Poly(rC) pro kg K.gew. langsam i.v. injiziert. Die Kontrolltiere erhielten gleichzeitig pro g K.gew. 0,01 ml physiologischer Kochsalzlösung. Die Aufarbeitung der Tiere erfolgte am 3. und 8. Tag nach Injektion.

3.1.4.2.2. Mehrmalige Applikation

Die Tiere erhielten in 24stündigem Abstand eine dreimalige Gabe von 12,5, 25, 37,5, 50 mg PVS, 25, 50, 100 mg DNA oder 0,25, 0,50 bzw. 1,0 mg Poly(rI)·Poly(rC) pro kg K.gew.. Den Kontrolltieren wurde nach dem gleichen Schema physiologische Kochsalzlösung verabreicht. 24 h und 72 h nach der letzten Injektion wurden die Tiere aufgearbeitet.

3.1.4.3. Anilinhydroxylase- und DNase II-Aktivität

Den Tieren wurden dreimal im Abstand von 24 Stunden 25 mg PVS, 100 mg DNA bzw. 0,50 mg Poly(rI)·Poly(rC) pro kg K.gew. verabfolgt. Die Kontrolltiere erhielten physiologische Kochsalzlösung nach dem gleichen Injektionsschema. 72 h nach der letzten Injektion wurden die Versuche beendet.

3.1.4.4. Einbau von Thymidin-2-¹⁴C in die DNA und von Phenylalanin-U-¹⁴C in Protein

3.1.4.4.1. Thymidin-2-¹⁴C-Einbau

24 h und 72 h nach der letzten Polyanioneninjektion (3.1.4.3.) wurde den Tieren Thymidin-2-¹⁴C in einer Dosis von 0,01 μ Ci/g K.gew. i.v. verabreicht. 1 Stunde später wurden die Tiere aufgearbeitet.

3.1.4.4.2. Phenylalanin-U-¹⁴C-Einbau

24 h nach der letzten von drei Polyanioneninjektionen (3.1.4.3.) erfolgte die Markierung der Tiere mit Phenylalanin-U-¹⁴C in einer Dosis von 0,04 μ Ci/g K.gew.. Die Dauer der Markierung betrug ebenfalls 1 h.

3.1.5. Aufarbeitung der Tiere

Vor Aufarbeitung wurden die Mäuse gewogen und anschließend in oberflächlicher Chloroformnarkose dekapitiert und entblutet. Unmittelbar nach Ausblutung wurden den Tieren zur Bestimmung der Reaktionsmaxima Leber, Milz und Thymus, zur Messung der DNase II-Aktivität Leber und Milz und zur Bestimmung der Anilinhydroxylase-Aktivität sowie des Thymidin-2-¹⁴C- und des Phenylalanin-U-¹⁴C-Einbaus nur die Leber entnommen.

Zur Aufarbeitung der Tiere im Zusammenhang mit der Isolierung von Hepatozyten s.u. (3.9.3.).

3.1.6. Behandlung der Proben

3.1.6.1. Bestimmung des relativen Frischgewichts der Organe

Sofort nach der Entnahme wurden die Organe gewogen und das relative Frischgewicht aus dem Quotienten $\frac{\text{Frischgewicht des Organs}}{\text{Gesamtgewicht des Tieres}}$ als Anteil des Organgewichts am Gesamtgewicht der Maus bestimmt.

3.1.6.2. Homogenisation der Organe

Sämtliche Homogenisationsvorgänge wurden unter Eiskühlung durchgeführt, um Verluste an Nukleinsäuren durch Nukleasenaktivitäten möglichst gering zu halten.

3.1.6.2.1. Lösungen

1. Physiologische Kochsalzlösung (3.1.4.1.1.).
2. Saccharoselösung: 0,25 mol/l dest. Wasser
3. TRIS-HCl-Puffer: 25 ml einer wäßrigen Lösung von 0,2 mol TRIS/l wurden bei 30° C mit 0,1 N Salzsäure auf pH 7,8 eingestellt und mit dest. Wasser auf 100 ml aufgefüllt.
4. Homogenisationslösung zur Bestimmung der Anilinhydroxylase-Aktivität: Der TRIS-HCl-Puffer (3.1.6.2.1.3.) wurde mit dest. Wasser im Verhältnis 1 : 20 weiterverdünnt. Diesem Puffer (TRIS-Konzentration von 2,5 mmol/l) wurden pro l 0,15 mol KCl und 5 mmol Nikotinsäureamid zugesetzt.

3.1.6.2.2. Homogenisation zum vollständigen Aufschluß der Zellen

Nach der Wägung wurden die Organe zusammen mit physiologischer Kochsalzlösung in einem Messerhomogenisator mit einem 4-Flügelmesser (Fa. BÜHLER, Tübingen) 1 min bei ca. 30 000 U/min homogenisiert. Während des Homogenisationsvorgangs betrug die Verdünnungsstufe des Homogenats max. 1 : 25. Falls nötig, wurden die Homogenate anschließend bis zur gewünschten Endkonzentration weiterverdünnt.

3.1.6.2.3. Homogenisation mit teilweisem Erhalt subzellulärer Organellen

Die Organe wurden nach Potter-Elvehjem mit einem Potter S-Homogenisator (Fa. BRAUN, Melsungen) 1 min bei 1500 U/min unter 4maligem Auf- und Abbewegen des rotierenden Kolbens in verschiedenen, je nach Versuchsablauf benötigten Lösungen homogenisiert.

3.2. Bestimmungen der Nukleinsäuren- und DNA-Konzentration

3.2.1. Prinzip

In Anlehnung an die Methoden von Schneider (155) und Zamenhof (187) wurden die Nukleinsäuren aus dem Organhomogenat mit kalter, wäßriger Lösung von 0,37 mol Trichloressigsäure (TCE)/l gefällt. ¹⁾

1) Dabei verbleiben im Überstand säurelösliche, vorwiegend niedermolekulare Bestandteile, wie freie Nukleotide, Kohlenwasserstoffe, organische und anorganische Phosphorverbindungen. Im Sediment befinden sich neben Nukleinsäuren und Proteinen auch noch Fettkörper, die vor allem wegen ihres Phospholipidanteils mit kaltem 96 %igen Äthanol extrahiert werden müssen. Durch Zusatz von 1,02 mol Kaliumacetat/l Äthanol können hierbei auftretende (bis zu 40 %ige) RNA-Verluste vermieden werden (129).

Aus dem Sediment wurden die Nukleinsäuren bei 90° C mit einer wäßrigen Lösung von 0,61 mol TCE/l herausgelöst. ¹⁾

Mit den im Hydrolysat vorhandenen N-haltigen Basen können Nukleinsäuren quantitativ spektrophotometrisch durch Messung der Extinktionsdifferenz bei 260 und 280 nm bestimmt werden. ²⁾

Durch Erfassung der 2-Desoxyribosederivate im Hydrolysat mit der DISCHE-Reaktion kann der DNA-Gehalt colorimetrisch bestimmt werden. Dabei ist die Extinktionsdifferenz zwischen 600 und 650 nm der

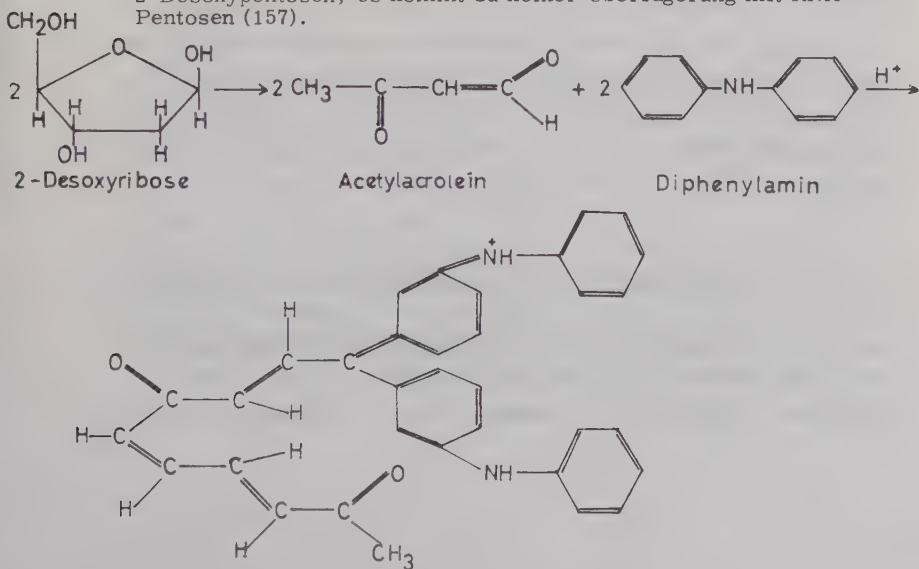
-
- 1) Die N-glykosidische Bindung der Pyrimidinnukleotide ist dieser Säurehydrolyse gegenüber stabiler als die der Purinnukleotide (157, 177), so daß sich im Hydrolysat als Zerfallsprodukte einer intermediären Schiff'schen Base, die nach Protonisierung des Sauerstoffatoms im Zuckerring und Spaltung des Furanoserings entstanden ist, freie Purinbasen und ein Derivat der 2-Desoxyribose befinden (177).
 - 2) Das Extinktionsmaximum für Nukleinsäuren liegt im UV-Bereich bei 260 nm, das Extinktionsminimum bei 232 nm. Etwaige Meßfehler durch Proteinverunreinigungen lassen sich durch Subtraktion der bei 280 nm, dem Absorptionsmaximum von Proteinen im UV-Bereich, gemessenen Extinktion von dem bei 260 nm erhaltenen Wert korrigieren. Eine weitere Möglichkeit zur Bestimmung von Proteinkontaminationen ist die Messung bei 232 nm (129). Bei Verwendung einer Lösung von 0,61 mol TCE/l als Referenzlösung braucht die hohe Eigenextinktion der TCE im UV-Bereich (Extinktionsmaximum bei 200 nm) nicht berücksichtigt werden.

DNA-Konzentration proportional (53). *)

3.2.2. Lösungen

1. TCE: 0,37 mol bzw. 0,61 mol TCE/l dest. Wasser (6 % bzw. 10 %).
2. Kaliumacetat: 1,02 mol Kaliumacetat/l Äthanol
3. Diphenylaminreagens: 100 ml einer Lösung von 59 mmol Diphenylamin in 1 l Eisessig wurden mit 2,5 ml Schwefelsäure (95 % - 97 %) versetzt. Das Reagens wurde im Kühlschrank aufbewahrt.

*) Im sauren Milieu setzt sich die 2-Desoxyribose zu Acetylacrolein um (60, 88), an das 2 mol Diphenylamin ankondensieren. Die so entstandene Leukobase wird durch Luftsauerstoff oxydiert und im sauren Milieu unter Ausbildung eines Kohlenstoffkations ionisiert, das sich durch eine Doppelbindung stabilisiert. Durch Anlagerung eines weiteren Acetylacroleinmoleküls unter Dehydrierung entsteht das Endprodukt der Reaktion mit einer krotonaldehydartigen Kette (88). Voraussetzung für die Farbreaktion ist die Kettenkonformation des Acetylacroleinmoleküls, in dem die Aldehydgruppe mit einer C-Doppelbindung verbunden ist. Den farbgebenden Reaktionsabschnitt bilden die Oxydation der Leukobase und die anschließende Protonisierung. Die DISCHE-Reaktion ist spezifisch für 2-Desoxypentosen, es kommt zu keiner Überlagerung mit RNA-Pentosen (157).



3.2.3. Ausführung

Die Organe wurden unter vollständigem Zellaufschluß homogenisiert (3.1.6.2.2.). Die Verdünnung der Homogenate betrug für Leber und Milz 1 : 25 und für den Thymus 1 : 100 (G/V). 2 ml der Homogenate wurden mit 4 ml 6 %iger TCE versetzt und nach 15 min Kühlung bei -15°C 20 min bei 6000 U/min (Laborzentrifuge JUNIOR II, Fa. CHRIST, Osterode) zentrifugiert. Der Überstand wurde dekantiert und das Sediment nochmals in 4 ml 6 %iger TCE resuspendiert und zentrifugiert. Dieses Sediment wurde in 4 ml 96 %igem Äthanol mit 1,02 mol Kaliumacetat/l gewaschen. Anschließend wurde das verbleibende Sediment in 5 ml 10 %iger TCE resuspendiert und 20 min bei 90°C im Wasserbad belassen. Nach 30 min Kühlung in der Tiefkühltruhe bei -15°C wurden die Proben erneut 20 min bei 6000 U/min zentrifugiert. Der klare Überstand wurde dekantiert und der DISCHE-Reaktion unterworfen, indem 1 ml des Überstandes mit 2 ml Diphenylaminreagens versetzt und 20 min im kochenden Wasserbad erhitzt wurde. Nach 20 min Abkühlung bei Zimmertemperatur wurde die Extinktionsdifferenz der Proben zwischen 600 und 650 nm (Spektralphotometer PMQ II, Fa. C. ZEISS, Stuttgart-Oberkochen) in 1 cm-Glasküvetten bei einer Spaltbreite von ca. 0,2 mm gegen eine Vergleichslösung aus 1 ml Aqua dest. und 2 ml Diphenylaminreagens gemessen.

Zur Messung der gesamten Nukleinsäurefraktion (DNA und RNA) wurde 1 ml des klaren Überstandes mit 9 ml dest. Wasser versetzt und in 1 cm Quarzküvetten bei 260 und 280 nm photometrisch gemessen. Als Vergleichslösung diente eine Mischung aus 1 ml 20 min auf 90°C erhitzter 10 %iger TCE und 9 ml dest. Wasser.

3.2.4. Berechnung der DNA-Konzentration und des DNA-Gehalts

Aus ΔE (= Extinktionsdifferenz zwischen 600 und 650 nm) wurde die DNA-Konzentration in mg DNA/ml Homogenat aus einer Eichkurve abgelesen, die mit der DNA-Lösung (3.1.4.1.3.) erstellt worden

war. Unter den gewählten Bedingungen entsprach eine Extinktionsdifferenz von 0,050 einer Konzentration von 0,1 mg DNA bzw. 8 μ g DNA-P/ml Vorlage. Der DNA-Gehalt wurde aus der DNA-Konzentration, dem Verdünnungsfaktor F_v und dem relativen Organgewicht errechnet:

$$\frac{\text{mg DNA}}{\text{ml}} \cdot F_v = \frac{\text{mg DNA}}{\text{g Frischgewebe}} = \text{Organanteil der DNA} \cdot 10^{-3}.$$

Organanteil der DNA $\cdot 10^{-3} \left(\frac{\text{mg DNA}}{\text{g Frischgewebe}} \right) \cdot \text{relatives Frischgewicht} = \text{DNA-Anteil (des betreffenden Organs) am Gesamtgewicht der Maus} \cdot 10^{-3}.$

3.3. Bestimmung der RNA-Konzentration

3.3.1. Prinzip

Aus dem Homogenat wurden die Nukleinsäuren extrahiert (3.2.1.). Die hydrolytisch freigesetzten Pentosen wurden mit dem Orcinreagens erfaßt und bei 670 nm colorimetrisch bestimmt. *)

*) Diese grüne B i a l-sche Farbreaktion tritt auf, wenn ein Pentosederivat mit Orcin (3,5-Dihydroxytoluol) in Gegenwart von HCl und FeCl_3 als Katalysator erhitzt wird (124, 157). Durch Erhitzen mit HCl wird die Pentose in ein ungesättigtes Aldehyd, das Furfural, übergeführt (60, 124), welches als das eigentliche Chromogen der Farbreaktion anzusehen ist und mit dem Orcin im Sinne einer aldolartigen Aldehyd-Phenol-Kondensation mit zwischengeschalteter Oxydation zu einem grünen Farbstoff reagiert. Dabei kann die Farbausbeute durch Oxydationsmittel, wie z. B. Fe^{3+} wesentlich erhöht werden (60). Von dieser Reaktion werden aber auch einige Aldoheptosen, Hexuronsäuren und vor allem die 2-Desoxyribose über ihr Derivat Acetylacrolein erfaßt. Jedoch ist die Farbsintensität bei RNA-Spaltprodukten 3- bis 4mal höher als bei DNA-Spaltprodukten (60, 157). Zur Bestimmung der RNA-Konzentration in einem Nukleinsäuren-Mischhydrolysat müssen die DNA-Spaltprodukte gesondert erfaßt und hinsichtlich ihres Extinktionsanteils bei 670 nm von der Gesamttextinktion abgezogen werden.

3.3.2. Lösungen

1. TCE: 0,37 mol (6 %ig) bzw. 0,61 mol (10 %ig) pro l dest. Wasser.
2. Kaliumacetat: 1,02 mol Kaliumacetat/l 96 %igem Äthanol
3. Orcinreagens: In 100 ml rauchender Salzsäure wurden 0,37 mmol Eisen(III)-Chlorid und anschließend 0,71 mmol Orcin gelöst. Die Lösung wurde vor Gebrauch frisch hergestellt.

3.3.3. Ausführung

Die Extraktion der Nukleinsäuren erfolgte aus den 1 : 100 verdünnten Organhomogenaten wie unter (3.2.3.). 1 ml des klaren Überstandes wurde mit 1 ml Orcinreagens versetzt und 45 min im kochenden Wasserbad erhitzt. Nach 20 min Abkühlung bei Zimmertemperatur wurden die Reaktionsgemische in 0,5-cm Glasküvetten bei 670 nm gegen dest. Wasser photometriert. Von der so erhaltenen Extinktion wurde die Extinktion des Reagentienleerwertes, bestehend aus 1 ml Aqua dest. und 1 ml Orcinreagens, abgezogen.

3.3.4. Berechnung

⚡ E zwischen Reaktionsgemisch und Leerwert ist nach Abzug des DNA-Anteils der RNA-Konzentration proportional.

1. Bestimmung des DNA-Anteils:

Der mit der DISCHE-Reaktion ermittelte DNA-Anteil wurde aus einer Eichkurve von DNA-Lösungen unterschiedlicher Konzentration, die der Orcinreaktion unterworfen worden waren, abgelesen. Dabei ergab sich für 0,1 mg DNA/ml Vorlage eine Extinktionsdifferenz von 0,041.

2. Bestimmung des RNA-Anteils:

Die RNA-Konzentration wurde entsprechend aus einer Eichkurve von RNA-Lösungen nach der Orcinreaktion bestimmt. Unter den gewählten Bedingungen entsprach eine Extinktionsdifferenz von 0,135 einer Konzentration von 0,1 mg RNA/ml Vorlage.

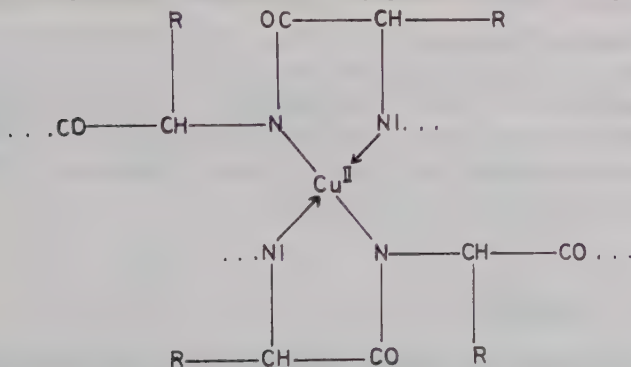
Die Berechnung des RNA-Gehalts erfolgte sinngemäß wie unter (3.2.4.).

3.4. Bestimmung der Proteinkonzentration

3.4.1. Prinzip

Die Proteinkonzentration wurde mit der von Bücher et al. vereinfachten Biuretmethode bestimmt (10). Bei Zusatz von Kupfersulfat zu einer alkalischen Polypeptidlösung entsteht eine violette Farbe mit einem Extinktionsmaximum bei 546 nm. Die Extinktionsdifferenz zwischen proteinhaltigem Reaktionsgemisch und dem Reagentienleerwert ist der Proteinkonzentration proportional. *)

*) Die Kupferionen bilden mit Eiweißen und Aminosäuren gefärbte Komplexe, die ein Ausfallen von Kupferhydroxid verhindern. Diese Reaktion ist typisch für mindestens 2-CO-NH-Gruppen, deshalb ist ein positiver Nachweis ab Tripeptiden möglich (23, p. 378 in 132).



Bei dieser Reaktion kommt es jedoch nicht zur Ausbildung eines Biuretmoleküls ($H_2N - CO - NH - CO - NH_2$), so daß man nur von einer "biuretähnlichen" Reaktion sprechen kann. (19)

3.4.2. Lösungen

1. Biuretreagens: 32 mmol Seignettesalz (K-Na-Tartrat) wurden in ca. 400 ml 0,2 N NaOH gelöst. Der Lösung wurden nacheinander 12 mmol feingepulvertes Kupfersulfat und 30 mmol Kaliumjodid zugesetzt. Dabei mußte jedes Salz vor Zugabe des nächsten vollständig gelöst sein. Anschließend wurde die Lösung mit 0,2 N NaOH auf 1000 ml ergänzt.
2. TCE: 0,37 mol/l dest. Wasser (6 %ig)
3. Äthanol 96 %ig

3.4.3. Ausführung

Die Organe wurden homogenisiert (3.1.6.2.2.). Leber und Milz wurden im Verhältnis 1 : 25, Thymus 1 : 100 verdünnt. 0,5 ml des Homogenats wurden mit 2,0 ml Aqua dest. und 2,5 ml Biuretreagens vermischt. Nach 30 min wurde die Extinktionsdifferenz gegenüber dest. Wasser in 2 cm-Glasküvetten bei 546 nm gemessen. Von dem erhaltenen Wert wurde die Extinktion des Reagentienleerwertes, bestehend aus 2,5 ml Biuretreagens und 2,5 ml dest. Wasser, abgezogen.

Bei lipidreichen Proben, wie Thymushomogenaten, entstand in diesem Arbeitsgang eine Trübung der Farblösung. Zur Vermeidung der Trübung wurden 0,5 ml des Homogenats mit 1,0 ml kalter 6 %iger TCE gefällt und 20 min bei 6000 U/min zentrifugiert. Das Sediment wurde anschließend 2mal in 1 ml 96 %igem Äthanol resuspendiert und zentrifugiert. Dieses Sediment wurde in 2,4 ml dest. Wasser aufgewirbelt und wie oben beschrieben weiterbehandelt..

3.4.4. Berechnung

Die Extinktionsdifferenz ΔE zwischen Reaktionsgemisch und Reagentienleerwert ist der Proteinkonzentration proportional.

bestimmt werden. *)

Die pro Zeiteinheit gebildete Menge an p-Ap ist der Anilinhydroxylase-Aktivität proportional.

3.5.2. Lösungen

1. Reaktionsmedium für die AH-Bestimmung:

TRIS-HCl-Puffer von pH 7,8 mit Substrat und Co-Faktoren in folg. Konzentrationen:

Anilin	8 mmol/l
MgCl ₂	10 mmol/l
Nikotinsäureamid	40 mmol/l
NADP ⁺	0,3 mmol/l
Glukose-6-Phosphat	10 mmol/l

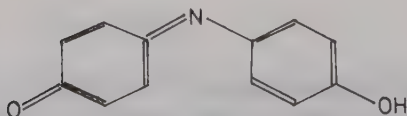
2. Extraktionsmedium:

Diäthyläther mit 34 mmol Amylalkohol/l

3. Farbreaktion:

106 mmol Phenol/l 0,1 N NaOH

*) Der farbgebende Reaktionsabschnitt ist die gemeinsame Oxydation von p-Ap und Phenol zu Indophenol, dessen farbgebende Komponente der p-chinoide Ring in Verbindung mit einer Hydroxylgruppe darstellt (p. 1588 in 132).



Indophenol

3.5.3. Mikrosomenpräparation

3.5.3.1. Prinzip

Die Mikrosomen wurden nach einem Schnellverfahren von Cinti (37) mit Ca^{2+} -Ionen gefällt.

Durch differentielle Zentrifugation werden Kerne und Mitochondrien aus dem Homogenat entfernt. Aus dem postmitochondrialen (12 500 x g -) Überstand können die Mikrosomen, die nach Zusatz von Ca^{2+} -Ionen aggregieren, bei 27 000 x g vollständig sedimentiert werden. Zur weitgehenden Entfernung von Calcium wird das Sediment anschließend ein oder mehrere Male in KCl-Lösung gewaschen.

3.5.3.2. Lösungen

1. Mikrosomensedimentation:

16 mmol CaCl_2 /l dest. Wasser

2. Mikrosomenwaschung:

0,15 mol KCl/l dest. Wasser

3.5.3.3. Ausführung

Die Lebern wurden in Homogenisationslösung (3.1.6.2.1.4.) in einem Verdünnungsverhältnis von 1 : 5 nach Schema (3.1.6.2.3.) homogenisiert. Die Proben wurden anschließend in einer Kühlzentrifuge (Typ UNIVERSAL JUNIOR III KS, Fa. CHRIST, Osterode) 5 min bei 600 x g geschleudert. Das Sediment aus Zellbruchstücken und Kernen wurde verworfen, der Überstand erneut bei 12 500 x g 10 min lang in einer Ultrazentrifuge (Typ SPINCO L2, Festwinkelrotor Ti 50, Fa. BECKMAN INSTR. Inc., Fullerton, Kalifornien) zentrifugiert. Aus dem über einem Präzipitat von Mitochondrien und einigen Mikrosomen stehenden postmitochondrialen (= mikrosomalen) Überstand (m.Ü.), der von einer dünnen Fettschicht überlagert war, wurden mit einer

Rekordspritze 5 ml abgezogen. Diese wurden mit einer gleichen Menge einer Lösung von 16 mmol CaCl_2 /l versetzt, so daß CaCl_2 in einer Endkonzentration von 8 mmol/l vorlag. Hieraus wurden die Mikrosomen durch 15 min Zentrifugation bei $27\,000 \times g$ sedimentiert. Der teilchenfreie Überstand wurde verworfen, das Sediment in 10 ml einer Lösung von 0,15 mol KCl /l resuspendiert und nochmals 15 min bei $27\,000 \times g$ zentrifugiert. Das resultierende Mikrosomenpellet war unterlagert von einem kleinen durchsichtigen Glykogenpellet, von dem es durch leichtes Antippen des Zentrifugenröhrchens getrennt wurde. Die Mikrosomen wurden dann zur Weiterverarbeitung in 1 bis 2 ml einer Lösung von 0,15 mol KCl /l aufgewirbelt.

Alle Zentrifugationsschritte wurden 0° und 4°C ausgeführt. Aufgrund der besseren Mengenausbeute an Protein und Anilinhydroxylase wurde zur Bestimmung der AH-Aktivität ein m. Ü. nach 25 min Zentrifugation bei $12\,500 \times g$ verwendet.

3.5.4. Ausführung der AH-Aktivitäts-Bestimmung

Für 3fach-Bestimmungen wurden jeweils 0,5 ml des Überstandes und 0,5 ml des Reaktionsmediums vermischt und 15 min in einem Schüttelthermostat (hauseigenes Modell) mit einer Amplitude von 20 mm und einer Frequenz von 200/min bei 37°C mit atmosphärischem Sauerstoff inkubiert. Die Reaktion wurde durch Zusatz von 5 ml eiskaltem Äther beendet. Nach mehrmaligem Schütteln (Überführung des gebildeten p-Ap in die Ätherphase) wurde das Extraktionsgemisch zur Phasentrennung 30 min bei -15°C eingefroren. Die nicht gefrorene Ätherphase wurde dekantiert, für die Farbreaktion mit 5 ml phenolischer Natronlauge versetzt und mehrmals kräftig durchgeschüttelt. Nach 60 min wurden aus der untenstehenden wäßrigen Phase ca. 3 ml abpipettiert und bei 620 nm in 1 cm-Glasküvetten gegen phenolische NaOH photometriert.

3.5.5. Berechnung der AH-Aktivität
(in der mikrosomalen Leberpräparation)

Die gebildete Menge an p-Ap wurde aus einer Eichkurve abgelesen, die mit einer Verdünnungsreihe einer p-Ap-Lösung (nach Indophenol-Farbreaktion) erstellt worden war. Unter den gewählten Bedingungen entsprach eine Extinktionsdifferenz von 0,002 der Konzentration von 1 nmol p-Ap pro ml Überstand. Zur Berechnung der spezifischen Aktivität wurde die pro min gebildete Menge an p-Ap auf die Proteinkonzentration des m. Ü. bezogen. Die Proteinmenge von 0,1 ml des m. Ü. wurde mit der Biuretmethode (3.4.) bestimmt.

Die spezifische Aktivität der AH wurde in $\frac{\text{nmol p-Ap}}{\text{mg Protein des m. Ü.} \cdot \text{min}}$ ausgedrückt.

Durch Korrektur der spezifischen Aktivität mit einem Faktor f, der für den Durchschnittswert des relativen Organgewichts der Kontrollen (= 100 %) 1,0 betrug, wurden Veränderungen des relativen Organgewichts berücksichtigt:

spezifische Aktivität der AH · f

3.6. Bestimmung der DNase II-Aktivität

3.6.1. Prinzip

In Anlehnung an die Methode von Allfrey und Mirsky (3) wurde die Aktivität der DNase II durch colorimetrische Messung der enzymatisch freigesetzten, TCE-löslich gewordenen DNA-Abbauprodukte mit der DISCHE-Reaktion (3.2.3.) bestimmt. *)

*) Die Freisetzung säurelöslich gewordener DNA-Spaltprodukte durch die DNase II erfolgt in einem 3phasigen Reaktionsablauf(18). In der ersten Phase kommt es ohne Änderung der spektralen Eigenschaften zu einer schnellen Veränderung der makromolekularen und biologischen Eigenschaften der DNA. Erst in der 2. und 3. Phase entsteht nach Spaltung der 5'-Phosphatesterbindung unter Bildung säurelöslicher Mono- bis Oligonukleotide als 3'-terminale Monoester (18, 105, 158) eine hyperchromatische Verschiebung, die entweder durch Erfassung der Basenanteile der Nukleinsäuren bei 260 nm (105, 158) oder des Desoxyriboseanteils mit der DISCHE-Reaktion bei 600 nm(3) dargestellt werden kann.

Unter optimalen Reaktionsbedingungen (so 37° C, pH 4,2 bis 5,5, einwertige Kationen in einer Konzentration von 0,2 bis 0,3 mol/l, Mg²⁺ unter 10⁻³ mol/l, 0,15 % DNA (3, 18, 105, 158)) tritt eine erschöpfende Hydrolyse ein, wenn ca. 25 bis 30 % der Internukleotidbindungen gespalten sind (16, 105, 158). Änderungen des pH-Werts oder der Elektrolytkonzentration, v. a. des Anteils an divalenten Kationen, haben keinen direkten Einfluß auf die DNase II-Aktivität, sondern wirken auf den Reaktionsablauf über eine Erhöhung bzw. Verringerung der Stabilität der Sekundärstruktur nativer DNA (18, 158). Über 0,15 % liegende DNA-Anteile bewirken eine Substrathemmung, da es zu weniger Aufbrüchen pro DNA-Längeneinheit und dadurch zu einer verringerten Anzahl an säurelöslichen Oligonukleotiden kommt (18).

3.6.2. Lösungen

1. Acetatpuffer: 39,5 ml einer wäßrigen Lösung von 1 mol Natriumacetat/l wurden mit Eisessig auf einen pH-Wert von 4,8 eingestellt und anschließend mit dest. Wasser auf 100 ml aufgefüllt.
2. Diphenylaminreagens (3.2.2.2.)
3. DNA-Lösung: Die aufgetauten Substratlösungen (3.1.4.1.3.) wurden zu gleichen Teilen mit dest. Wasser versetzt.
4. TCE: 3,6 mol/l dest. Wasser

3.6.3. Ausführung

Leber und Milz wurden wie unter (3.1.6.2.2.) mit physiologischer Kochsalzlösung im Verhältnis 1 : 25 bzw. 1 : 50 homogenisiert. Jeweils 0,5 ml des Organhomogenats und 0,5 ml DNA-Lösung (3.6.2.3.) wurden mit 2,0 ml Acetatpuffer (entsprechend einer Acetatendkonzentration von 0,26 mol/l) versetzt und anschließend 60 min bei 37° C inkubiert. Durch Zugabe von 0,85 ml kalter TCE in einer Konzentration von 3,6 mol/l (entsprechend einer TCE-Endkonzentration von 0,76 mol/l) wurde die Reaktion beendet. Nach 20 min Aufbewahrung bei - 15° C wurden die Proben 20 min bei 6000 U/min zentrifugiert. Jeweils 1 ml des klaren Überstands wurde der DISCHE-Reaktion (3.2.3.) unterworfen bzw. mit 9 ml dest. Wasser versetzt und bei 600 bzw. 260 nm spektrophotometrisch gegen entsprechende, von DNA-Abbauprodukten freie Vergleichsgemische (3.2.3.) gemessen.

3.6.4. Berechnung der DNase II-Aktivität

Ausdruck der Enzymaktivität ist der zeitabhängig gemessene Anstieg der Extinktionsdifferenz (ΔE) von Probe und Leerwert (Substratzusatz erst nach Beendigung der Inkubation durch Fällung mit TCE).

Die gebildete Menge an säurelöslichen DNA-Abbauprodukten wurde als $\mu\text{g DNA-P/ml}$ Vorlage aus einer Eichkurve der DNA-Lösung (3.1.4.1.3.) abgelesen, die zuvor der DISCHE-Reaktion unterworfen und bei 600 nm gemessen worden war. Unter den gewählten Bedingungen entsprach eine Extinktionsdifferenz von 0,010 einer Konzentration von 1 $\mu\text{g DNA-P/ml}$.

Zur Berechnung der spezifischen Aktivität der DNase II wurde die pro min gebildete Menge an DNA-P auf die Proteinkonzentration (bestimmt mit der Biuretreaktion w.u. 3.4.) des Organhomogenats bezogen:

$$\text{spezifische Aktivität der DNase II} = \frac{\mu\text{g DNA-P}}{\text{mg Homogenatsprotein} \cdot \text{min}}$$

Zur Kontrolle der mit der DISCHE-Reaktion bestimmten Werte wurde aus den im UV-Bereich bei 260 nm erhaltenen Werten ebenfalls die spezifische Aktivität der DNase II als

$$\frac{\Delta E}{\text{mg Homogenatsprotein} \cdot \text{min}} \quad \text{errechnet.}$$

Veränderungen des relativen Organgewichts wurden berücksichtigt durch Korrektur der spezifischen Aktivität mit einem Faktor, der für den Durchschnittswert der Kontrollen (= 100 %) 1,0 betrug:

$$\text{spezifische Aktivität der DNase II} \cdot f.$$

3.7. Messung des Einbaus von Thymidin-2-¹⁴C in die DNA

3.7.1. Prinzip

Der Einbau von ¹⁴C-markiertem Thymidin als spezifische Vorstufe bei der DNA-Biosynthese wurde nach Säurefällung, Reinigung und

Extraktion der DNA im Hydrolysat radiometrisch gemessen (29, 35, 55, 137). *)

3.7.2. Lösungen

1. TCE: 0,61 bzw. 0,37 mol/l Wasser (6 bzw. 10 %ig)
2. Kaliumacetat: 1,02 mol/l 96 %igem Äthanol
3. Diphenylaminreagens: (3.2.2.2.)

3.7.3. Ausführung

Nach Vorbehandlung der Versuchstiere wie unter (3.1.4.4.1.) wurden die Lebern entnommen und nach Schema (3.1.6.2.2.) mit physiologischer Kochsalzlösung im Verhältnis 1 : 6 homogenisiert. 2 ml des Homogenats wurden mit 4 ml kalter 6 %iger TCE gefällt und nach 15 min Kühlung bei -15°C 20 min lang mit 6000 U/min zentrifugiert.

*) Die spezifische DNA-Base Thymin wurde dem Nukleotidstoffwechsel als Nukleosid angeboten, da der Desoxyribose-1- P -Bestand der Zelle zu gering ist, um einen genügenden Einbau der Base zu gewährleisten (137). In DNA-synthetisierenden Zellen wird Thyminid schnell eingebaut (44), darf aber im Gegensatz zu in vitro Versuchen nicht als Phosphorester vorliegen, da es nur in nicht-ionisierter Form die Zellmembran durchdringen kann (137).

Die Fällung und Extraktion der DNA kann sowohl mit Perchlorsäure (29, 35, 55) als auch mit TCE (55, 137) erfolgen, wobei 5 und 10 %ige TCE gute Anfangsausbeuten ergeben. Mit steigender Dauer der Hydrolyse (über 40 min) und zunehmendem Proteingehalt (bei einem Verhältnis von Protein : DNA über 1 : 10) kommt es jedoch zu einer Readsorption der DNA an das Sediment (55). Bei Anwendung der SCHNEIDER-Methode zur Isolierung der Nukleinsäuren (erschöpfende Hydrolyse nach ca. 15 min) (129) aus Leberhomogenaten (DNA : Protein ca. 1 : 100) (4, 99) erlangen diese Störfaktoren keine Bedeutung.

Für Messungen im Methandurchflußzähler sind ^{14}C -markierte Präparate ^3H -Präparaten vorzuziehen (137), da das Kohlenstoffisotop mit einer 8,6fach höheren β -Strahlungsenergie (von 0,155 MeV) wesentlich höhere Ausbeuten als Tritium (0,018 MeV) liefert (5).

Das Sediment wurde anschließend zweimal in 6 %iger TCE und dreimal in Kaliumacetat enthaltenden 96 %igen Äthanol gewaschen. Die hydrolytische Extraktion der Nukleinsäuren aus dem Sediment und die Bestimmung der DNA-Konzentration erfolgte wie unter (3.2.3.). Die Messung der ^{14}C -Aktivität erfolgte in 3fach-Bestimmungen auf eloxierten Aluminiumplättchen mit einem Durchmesser von 30 mm (Fa. FRIESECKE & HOEPFNER GmbH, Erlangen-Bruck), auf denen jeweils 0,1 ml des klaren Überstandes ausgebreitet worden war. Nach Lufttrocknung wurde jedes Plättchen 10 min lang in einem Methan-durchflußzähler (Zählrohr FH 47 mit Handprobenwechsler, Zählgerät FH 49, Fa. FRIESECKE & HOEPFNER) bei konstantem Gasfluß, einer Arbeitsspannung von 2,7 kV und einer Eingangsempfindlichkeit von 1 mV radiometriert.

3.7.4. Berechnung des Einbaus von ^{14}C -markiertem Thymidin in die DNA

Unter den o. e. Bedingungen betrug die Meßausbeute auf der gesamten Breite des Spannungsplateaus für ^{14}C von 2,5 bis 2,9 kV durchschnittlich 47 %.

Ausdruck des Einbaus von Thymidin-2- ^{14}C in die DNA ist die Impulsrate pro Gewichtseinheit DNA.

Berechnung der DNA-Konzentration in mg/ml s. u. (3.2.4.).

Impulsrate (bezogen auf 1,0 ml) =

$$\frac{\text{Gesamtimpulse} - \text{Impulse des Untergrunds}}{\text{min}} \cdot 10$$

Die Impulsrate des Untergrunds belief sich unter den gewählten Bedingungen auf 40 bis 60 Impulse/min und wurde vor jeder Messung neu bestimmt.

$$\frac{\text{Impulsrate}}{\text{mg DNA}} = \frac{\text{spezifische Aktivität (der DNA)}}{\text{ml Homogenat}}$$

3.8. Messung des Einbaus von Phenylalanin-U¹⁴-C in Protein
des mikrosomalen (12 500 x g-) Überstands

3.8.1. Prinzip

Der Einbau von Phenylalanin-U-¹⁴C in Protein des mikrosomalen Überstands (m. Ü.) der Leber wurde in Anlehnung an die Methode von Brade, Jarck und Vetter (22) am säuregefällten und anschließend in Biuretreagens aufgelösten Sediment des m. Ü. radiometrisch gemessen. *)

*) Die Mikrosomenfraktion besteht neben einem geringen, wechselnden Anteil an Lysosomen und Bruchstücken der Mitochondrien, der Kern- und Zellmembran, sowie des Golgi-Apparates und des Zentriols, vorwiegend aus Komponenten des endoplasmatischen Retikulums (E.R.) (p. 373 in 20). In Protein sezernierenden Zellen (Leber: Parenchymzelle) befinden sich die proteosynthetischen Zellorganellen, die Ribosomen, aufgrund ihrer Assoziierung an die Membranoberfläche des Ergastoplasmas, einem spezialisierten Anteil des E.R. ("rauhe" Form des E.R.) (p. 374 in 20), in dem mikrosomalen Sediment (z. B. nach Ca²⁺-Fällung). In proliferativ aktiven Zellen mit überwiegender Proteinsynthese für den Eigenbedarf (Leber: Retikulozyten und andere Anteile des RES) sind die Ribosomen frei im Zytoplasma und nicht an das E.R. und damit an die Mikrosomenfraktion gebunden (p. 441 in 20, 28). Im Gegensatz zur Mikrosomensedimentation, bei der die freien Ribosomen im Überstand verbleiben, enthält der postmitochondriale (mikrosomale) 12 500 x g-Überstand neben anderen Komponenten (v. a. Serumproteine) die Zentren der Proteinbiosynthese beider Zelltypen.

Nach der SCHNEIDER-Methode werden die Proteine aus dem m. Ü. mit Säure gefällt. Das säureunlösliche Sediment enthält neben Proteinen v. a. Lipide, die mit Äthanol extrahiert werden, und einen geringen Anteil an DNA mitochondrialer Herkunft. Durch vollständiges Auflösen des Sediments in Biuretreagens können Verluste in der Zählprobe durch Selbstabsorption bei zu großer Partikelgröße vermieden werden.

3.8.2. Lösungen

1. T C E: 0,37 mol/l dest. Wasser (6 %ig)
2. Äthanol 96 %ig
3. Biuretreagens (3.4.2.1.)

3.8.3. Ausführung

Nach Vorbehandlung der Versuchstiere (3.1.4.4.2.) wurden die Lebern entnommen und in Saccharoselösung (3.1.6.2.1.2.) in einem Verdünnungsverhältnis von 1 : 15 nach Schema (3.1.6.2.3.) homogenisiert. Aus diesen Proben wurde nach dem Herausschleudern der Kerne ein m. Ü. durch 25 min Zentrifugation bei $12\,500 \times g$ wie unter (3.5.3.3.) hergestellt. 2 ml des Überstands wurden mit 4 ml kalter TCE gefällt und nach 15 min Kühlung bei -15°C mit 6000 U/min geschleudert. Das Sediment wurde anschließend noch einmal in TCE und zweimal in Äthanol gewaschen. Das verbleibende Sediment wurde in 1,5 ml dest. Wasser und 1,5 ml Biuretreagens resuspendiert und ca. 30 min bis zur vollständigen Lösung geschüttelt. 0,1 ml der dunkelvioletten Lösung wurde auf ein Meßplättchen aufgetragen und wie unter (3.7.3.) radiometriert. Zur Bestimmung der Proteinkonzentration des m. Ü. wurde ein entsprechender Teil der Lösung mit dest. Wasser und Biuretreagens $\overline{\text{aa}}$ bis zu einer Endkonzentration von 1 : 100 weiterverdünnt.

3.8.4. Berechnung des Einbaus von Phenylalanin- $\text{U-}^{14}\text{C}$ in Protein des m. Ü.

Ausdruck des Einbaus von Phenylalanin- $\text{U-}^{14}\text{C}$ in das Protein des m. Ü. ist die Impulsrate pro Gewichtseinheit Protein.

Berechnung der Proteinkonzentration in mg/ml des m. Ü.

Impulsrate als Imp./min s.u. (3.7.4.)

$$\frac{\text{Impulsrate}}{\text{mg Protein des m. Ü.}} = \text{spezifische Aktivität (des Proteins des m. Ü.)}$$

3.9. Isolierung von Hepatozyten und Messung des Einbaus von Thymidin-2-¹⁴C in die DNA der Leberzellen

3.9.1. Prinzip

In Anlehnung an die Methode von Howard et al. (85, 86) wurden die Hepatozyten aus dem Zellverband der Leber mit lytischen Enzymen in Ca^{2+} -freier Hanks-Lösung durch Perfusion und Inkubation herausgelöst und durch differenzierte Filtration und Zentrifugation isoliert. Die Messung der Zerfallsaktivität des in die DNA eingebauten Thymidin-2-¹⁴C erfolgte w. u. (3.7.), ebenso wie die Bestimmung der verbleibenden Restaktivität in der DNA anderer zellulärer Leberbestandteile aus den gepoolten und gereinigten Überständen der einzelnen Zentrifugationsschritte. *)

*) Die Herauslösung der Leberzellen aus dem Zellverband erfolgt bei dieser Versuchsanordnung auf zwei verschiedene Arten:

1. Enzymatische Auflösung der geformten und ungeformten Grundsubstanz mit Kollagenase und Hyaluronidase.
2. Verflüssigung der Matrix und Auflösung des Zellzements durch Beseitigung von Ca^{2+} .

Zu 1.: Substrate der Hyaluronidase sind die Hyaluronsäure und die Chondroitinschwefelsäure, Hauptbestandteile der ungeformten Grundsubstanz des Stütz- und Bindegewebes. Diese Mukopolysaccharide werden in einem 2phasigen Reaktionsablauf zuerst depolymerisiert und anschließend bis zu geradzahligen Oligosacchariden abgebaut (59, p. 1523 in 132, 147). Die Wirkung der Kollagenase besteht im Abbau von kollagenen und elastischen Fasern, die zuerst durch Auflösung des interfibrillären Mukoids in einzelne Fasern aufgesplittert und dann durch Angriff an den fibrillären Elementen zu Gelatine und Glutin abgebaut werden (59, 147).

Zu 2.: Der Entzug von Ca^{2+} bewirkt eine Verflüssigung der Matrix mit folgender Trennung der Zellen. In Konzentrationen über 0,06 bis 0,08 mol/l verhindert Ca^{2+} eine Disaggregation durch Stabilisierung der interzellulären Matrix und des Zellzements aufgrund einer Koazervatbildung zwischen negativen Mukopolysacchariden und amphoteren Proteinen (147, 156).

Bei Verwendung einer Ca^{2+} -freien Hanks-Lösung ("balanced salt solution") (77) mit einem Zusatz von 1000 E Hyaluronidase (= 0,1 %) und 0,075 U Kollagenase (= 0,05 %) pro ml können beide Effekte gleichzeitig ausgenutzt werden.

3.9.2 Lösungen

1. Hanks-Lösung (ohne Ca^{2+} und ohne Glukose):

In 1 l dest. Wasser (Leitfähigkeit $\leq 0,1 \mu\text{S}$) wurden 136,9 mmol Natriumchlorid, 5,36 mmol Kaliumchlorid, 0,81 mmol Magnesiumsulfat, 0,33 mmol di-Natriumhydrogenphosphat-2 hydrat und 0,36 mmol Kaliumdihydrogenphosphat gelöst. Diese Lösung wurde nach Zusatz von 25 ml einer isotonischen wäßrigen Lösung von 167 mmol Natriumbikarbonat/l im Kühlschrank aufbewahrt. Um Überlagerungen bei Farbreaktionen zu vermeiden, wurde auf den Zusatz von Phenolrot verzichtet.

2. Perfusions- und Inkubationsmedium:

Der o.e. Hanks-Lösung wurden pro ml 0,0055 mmol Glukose, 1000 E Hyaluronidase und 0,075 U Kollagenase zugesetzt. Diese Lösung wurde vor jedem Versuch frisch hergestellt.

3. T C E: 0,37 bzw. 0,61 mol/l dest. Wasser (6 bzw. 10 %ig)

4. Kaliumacetat: 1,02 mol/l 96 %igen Äthanol

5. Diphenylaminreagens: (3.2.2.2.)

3.9.3. Ausführung

Nach Vorbehandlung w.u. (3.1.4.4.1.) wurde den Versuchstieren in Äthernarkose die Bauchhöhle eröffnet und die hintere Hohlvene dicht kranial der Einmündungen der Vv. renales ligiert. Anschließend wurde nach Eröffnung der Brusthöhle die hintere Hohlvene knapp kaudal des Herzens freipräpariert und kanüliert. Bei noch schlagendem Herzen wurde die Leber 5 min mit 1 ml eiskaltem Perfusionsmedium pro min ohne Rezirkulation durchströmt. Durch den Perfusionsdruck dehnte sich die Leber aus und wurde zunehmend heller, bis nach 2 min Perfusionsdauer die V. portae durchtrennt wurde. Um eine möglichst vollständige Entblutung zu gewährleisten, wurden die einzelnen Leberlappen während der restlichen Perfusionszeit ständig hin-

und herbewegt. Nach Abschluß der Perfusion wurde die Leber rasch herausgenommen und in einem gekühlten Glasgefäß mit einem Gewebeschnneider aus 3 parallelen Rasierklingen in einem Abstand von 5 mm (eigene Konstruktion) in kleine Stücke zerschnitten. Diese Leberstücken wurden in einem 50 ml Erlenmeyerkolben zusammen mit 5 ml Inkubationsmedium 70 min in einem Schüttelthermostat (hausteigenes Modell) mit einer Amplitude von 20 mm und einer Frequenz von 200/min bei 37° C unter atmosphärischem Sauerstoff inkubiert. Während dieser Zeit löste sich die Leber vollständig auf. Die entstandene Leberzellsuspension wurde durch eine einzelne Lage eines Nylonstrumpfes filtriert und mit 20 ml kalter, Ca^{2+} - und glukosefreier Hankslösung nachgespült. Auf dem Filter blieben nur ganz geringe Mengen nichtfiltrierbarer Bindegewebsstränge von Leberkapsel und -pforte und nicht perfundiertem (infarziertem) Lebergewebe zurück. Die Zellsuspension wurde dann in einem zweiten Filtrationsschritt durch ein Netz aus nichtrostendem Stahl mit einer Maschenweite von 0,063 mm und einem Drahtdurchmesser von 0,045 mm (nach DIN 4188, Bl. 1 und ISO/R 565) mit weiterer Ca^{2+} - und glukosefreier Hanks-Lösung bis zu einem Endvolumen von ca. 40 ml filtriert. Das Filtrat wurde anschließend 1 min mit 50 x g und nach Resuspension in 10 ml o.e. Hanks-Lösung 1 min mit 20 x g in einer Kühlzentrifuge (Typ UNIVERSAL JUNIOR III KS, Fa. CHRIST, Osterode) bei 4° C zentrifugiert. Die von zellulären Bestandteilen weitgehend freien Überstände wurden mit einer Pipette abgesaugt und aufgehoben. Das verbleibende Sediment aus Hepatozyten und einem geringen Anteil an Zelldetritus wurde zur Weiterverarbeitung in 1,5 ml der o.e. Hanks-Lösung resuspendiert. Die Aufwirbelung der Sedimente beider Zentrifugationen erfolgte nach Aufblasen der Flüssigkeit mit einer Pipette auf das Pellet durch zweimaliges Aufziehen in einer Pipette mit einem inneren Spitzendurchmesser von 2 mm.

Die gesammelten Überstände und die Hepatozytensuspension wurden in einem Messerhomogenisator 1 min mit ca. 30 000 U/min bei Eiskühlung unter weitgehender Zerschlagung aller zellulärer Membranen und Organellen homogenisiert.

Zur Bestimmung des Trockengewichts wurden jeweils 0,1 ml der Ho-

mogenate auf vorgewogenen Aluminiumplättchen verteilt und getrocknet.

Die Extraktion und Bestimmung der ^{14}C -markierten DNA erfolgte sinngemäß w.u. (3.7.):

1 ml des Hepatozytenhomogenats wurde mit 2 ml kalter 6 %iger TCE gefällt und in 2,5 ml 10 %iger TCE hydrolysiert.

20 ml des homogenisierten Überstandes wurden mit 40 ml TCE gefällt, auf 4 ml eingengt und in 5 ml TCE hydrolysiert.

Vorversuche mit isolierten Hepatozyten:

Da für die zu untersuchenden Parameter nicht biochemisch, sondern nur morphologisch voll intakte Hepatozyten benötigt wurden, konnte auf Carbogenbegasung während der Inkubation verzichtet werden. Dieser Umstand muß allerdings bei der Beurteilung von Vitalitätskriterien berücksichtigt werden. Ein brauchbares Vitalitätskriterium für isolierte Zellen stellt die Membranpermeabilität für Trypanblau dar (98): in lebende Zellen kann Trypanblau nicht eindringen.

Zur Untersuchung wurden 100 μl der Zellsuspension mit 300 μl einer isotonischen Lösung von 6,2 mmol Trypanblau/l (0,16 mmol Trypanblau und 2,02 mmol NaCl wurden in 25 ml Aqua bidest. gelöst und durchfiltriert) auf dem Objektträger vermischt und sofort lichtmikroskopisch untersucht. Gleichzeitig erfolgte eine lichtmikroskopische Beurteilung des morphologischen Zustandes der Hepatozyten.

Als Maß für die Anreicherung von Hepatozyten gegenüber anderen zellulären Leberbestandteilen (v. a. des RES) galt der Abfall der DNase II-Aktivität in der Hepatozytensuspension gegenüber einem Gesamtleberhomogenat. Die Bestimmung der DNase II-Aktivität erfolgte analog w.u. (3.6.).

3.9.4. Berechnung des Einbaus von Thymidin-2-¹⁴C in die DNA isolierter Hepatozyten und in die DNA enthaltenden Bestandteile der gepoolten Zentrifugationsüberstände

1. Meßausbeute s.u. (3.7.4.)
2. Bestimmung des Trockengewichts in g/ml
3. Berechnung der DNA-Konzentration mg/ml s.u. (3.2.4.)
4. Ausdruck des Einbaus von Thymidin-2-¹⁴C in die DNA ist die Impulsrate pro Gewichtseinheit DNA.
Berechnung der Impulsrate s.u. (3.7.4.)

$$\frac{\text{Impulsrate}}{\text{mg DNA}} = \frac{\text{spez. Akt. der DNA (pro ml Zellsusp. bzw. pro ml der gepoolten Überstände)}}{\text{mg DNA}}$$

5. Berechnung des DNA-Gehalts als DNA-Anteil am Trockengewicht. 10^{-3}

3.10. Fehlerberechnung und Signifikanzanalyse

3.10.1. Fehlerberechnung

Die Streuung der Einzelwerte einer Gruppe um das Gruppenmittel wurde nach folgender Formel berechnet:

$$s_x = \sqrt{\frac{\sum (x_i - \bar{x})^2}{n - 1}}$$

Erläuterung der Indices:

s_x = Standardabweichung

x_i = Einzelwert einer Stichprobe

$\bar{x}$ = arithmetisches Mittel der Stichproben

n = Anzahl der Stichproben

3.10.2. Signifikanzanalyse

Die Signifikanzanalyse erfolgte nach STUDENTs "t-Test" (p. 72 in 30).

a) Varianzdifferenz $S_{\text{Diff.}}$

$$S_{\text{Diff.}} = \sqrt{\frac{\sum (x'_i - \bar{x}')^2 + \sum (x''_i - \bar{x}'')^2}{n' + n'' - 2}} \cdot \frac{n' + n''}{n' \cdot n''}$$

b) Testgröße t

$$t = \frac{\bar{x}' - \bar{x}''}{S_{\text{Diff.}}}$$

c) Freiheitsgrad FG

$$FG = n' + n'' - 2$$

Erläuterung der Indices:

x'_i bzw. x''_i = Einzelwerte zweier Versuchsreihen

$\bar{x}'$ bzw. $\bar{x}''$ = arithmetisches Mittel der jeweiligen Einzelwerte zweier Versuchsreihen

n' bzw. n'' = Anzahl der Stichproben zweier Versuchsreihen

d) Bestimmung der Zufallswahrscheinlichkeit p

Aus der Verteilung der Testgröße t ergibt sich in Abhängigkeit von den Freiheitsgraden eine bestimmte Zufallswahrscheinlichkeit p (p. 72 in 30, 52). Als signifikant gilt eine Zufallswahrscheinlichkeit $p < 0,05$. Unter dieser Voraussetzung beträgt die Wahrscheinlichkeit, daß eine Beobachtung innerhalb des Intervalls von $-t$ bis $+t$ liegt, mindestens 95 %, die Irrtumswahrscheinlichkeit höchstens 5 % (p. 72 in 30).

e) Prüfung auf Normalverteilung

Soweit möglich und erforderlich, erfolgte die Prüfung auf Normalverteilung der einzelnen Stichproben mit der Summenprozentkurve (p. 153 in 30).

3.11. Meßgrößen und Einheiten

Entsprechend Empfehlungen von ISO (International Organisation for Standardization), IFCC (Int. Federation of Clinical Chemistry), IUPAC (Int. Union of Pure and Applied Chemistry), sowie Schweizerischer, Österreichischer und Deutscher Gesellschaft für Klinische Chemie wurden die Meßgrößen und Einheiten des neuen internationalen Systems der Meßeinheiten (SI) verwendet, das die bisher benutzten Maßsysteme (cgs bzw. mks) ablöst (100).

Hierdurch ergaben sich folgende Änderungen der bisherigen Bezeichnungen:

1. Konzentrationen wurden, soweit möglich, auf molekularer Basis als "Stoffmengenkonzentration" mit der Einheit "mol/l" und nicht als Massenkonzentration angegeben. Die Meßgröße "Molarität" mit der Einheit "M" wurde nicht mehr benutzt.
2. Die Bezeichnung "%" entfiel für die Kennzeichnung von Konzentrationen. Dieser Begriff fand nur noch Anwendung bei der Beschreibung von Veränderungen in Relation zur Ausgangsbasis.
3. Dimensionslose Meßgrößen erhielten die Dimension "1" und kohärent abgeleitete SI-Einheiten. Dementsprechend erhielt die Meßgröße "Massenverhältnis" statt der bisherigen Einheiten g/g bzw. mg/g die Dimension 1 bzw. 10^{-3} .

4. ERGEBNISSE

4.1. Kontrollwerte

In der Tabelle 9 sind die im Verlauf aller Versuchsreihen erhaltenen mittleren Vergleichswerte der Kontrolltiere mit Standardabweichungen zusammengestellt. Relativ hohe Variationskoeffizienten sind u. a. dadurch bedingt, daß bei den Werten weder Zeitmarken noch Unterschiede bei den Aufarbeitungen in den einzelnen Versuchsreihen berücksichtigt wurden.

	rOg	DNA $\times 10^{-3}$	RNA $\times 10^{-3}$	Prot. $\times 10^{-3}$	DNase II	AH
Leber	0,060	2,52	14,54	228,3	0,129	0,174
	$\pm 0,0075$	$\pm 0,026$	$\pm 1,81$	$\pm 27,9$	$\pm 0,017$	$\pm 0,019$
n =	188	126	40	84	18	20
Milz	0,0076	13,9	16,2	210,4	0,36	n. b.
	$\pm 0,0021$	$\pm 4,08$	$\pm 4,47$	$\pm 72,4$	$\pm 0,12$	----
n =	88	64	40	58	18	----
Thymus	0,0032	20,51	14,02	253,3	n. b.	n. b.
	$\pm 0,0004$	$\pm 2,81$	$\pm 1,92$	$\pm 34,8$	----	----
n =	64	64	36	56	----	----

Tab. 9: Vergleichswerte von Kontrolltieren:

relatives Organgewicht (rOg) (als Organanteil am Gesamtgewicht der Maus),
 DNA-, RNA- und Proteingehalt der Organe $\times 10^{-3}$ (als DNA-, RNA- und Protein-Anteil am Gesamtgewicht des Organs),
 DNase II-Aktivität als μg DNA-P/min/mg Homogenatsprotein und Anilinhydroxylase (AH)-Aktivität als nmol p-Ap/min/mg Protein des mikrosomalen Überstandes.
 (n. b. = Wert wurde nicht bestimmt).

4.2. Ergebnisse zur Methodik

4.2.1. DNA-Abbau an DNase II aus Leber und Milz: Inkubationsdauer und Enzymkonzentration

Wie Abb. 5 und 6 zeigen, blieb die Geschwindigkeit des Abbaus von DNA an DNase II in Leber und Milz bei den 3 gewählten Homogenatkonzentrationen 60 min lang praktisch gleich.

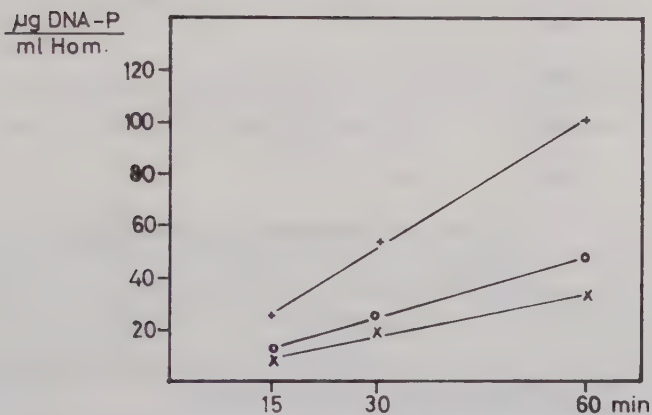


Abb. 5: DNA-Abbau an DNase II aus Leber in Abhängigkeit von Inkubationsdauer und Enzymkonzentration.

Legende s. Abb. 6

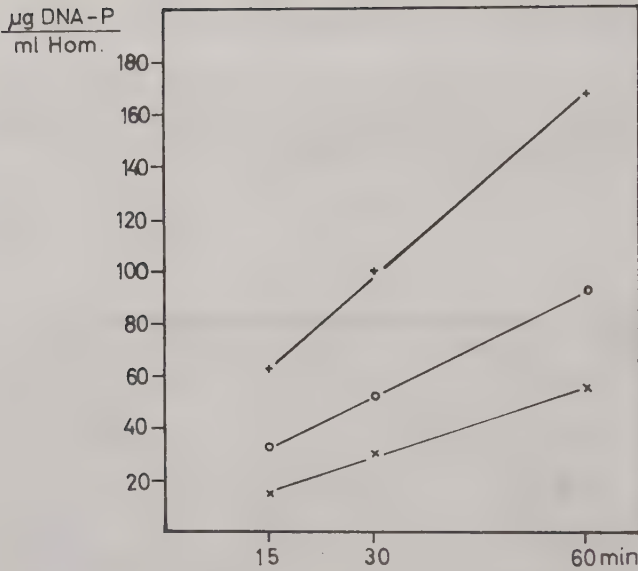


Abb. 6: DNA-Abbau an DNase II aus Milz in Abhängigkeit von Inkubationsdauer und Enzymkonzentration.

Abszisse: Inkubationsdauer in min

Ordinate: freigesetzte µg DNA-P pro ml Homogenat

Kennzeichnung der Kurven:

+: Homogenatverdünnung 1 : 25

o: Homogenatverdünnung 1 : 50

x: Homogenatverdünnung 1 : 100

n = 8 Tiere

4.2.2. Mikrosomenpräparation:

Unterschiede zwischen den einzelnen Präparationsschritten

4.2.2.1. Protein

Vom Gesamtprotein des 1 : 5 verdünnten Leberhomogenats (= 100 %) waren im mikrosomalen (12 500 x g-) Überstand (m. Ü.) noch 60,8 %, im Ca^{2+} -gefällten, 1-mal im KCl-Lösung gewaschenen mikrosomalen Pellet 11,1 % aufzufinden (Abb. 7).

Wurde das Pellet noch 2mal in KCl-Lösung gewaschen, verringerte sich die Ausbeute an mikrosomalem Protein von 5,66 mg/ml Mikrosomensuspension nach der 1. Waschung auf 2,72 mg/ml nach der 3. Waschung (Abb. 8).

Von den 12,46 mg Protein/ml m. Ü. waren nach Säurefällung und anschließender 4maliger Waschung noch 11,52 mg/ml vorhanden (Abb. 9).

4.2.2.2. Einbau von Phenylalanin- ^{14}C

Im Zuge der Mikrosomenpräparation fiel die Impulsrate in wesentlich geringerem Umfang als der Proteingehalt ab, wodurch ein starker Anstieg der spezifischen ^{14}C -Aktivität des Proteins bewirkt wurde (Abb. 7).

Durch KCl-Waschungen verminderte sich die Gesamtaktivität des mikrosomalen Sediments in ähnlichem Ausmaß wie die Proteinkonzentration, so daß die spezifische ^{14}C -Aktivität des Proteins vor und nach den Waschungen keine signifikanten Unterschiede aufwies (Abb. 8).

Auch nach Säurefällung des m. Ü. und 4maliger Waschung blieb die spezifische Aktivität des im Präzipitat enthaltenen Proteinanteils aufgrund eines proportionalen Absinkens von Gesamtaktivität und Proteinkonzentration unverändert (Abb. 9).

Die Impulsraten zeigten keine nennenswerte Abhängigkeit von der Markierungsdauer (30 bzw. 60 min) (Abb. 8 und 9).

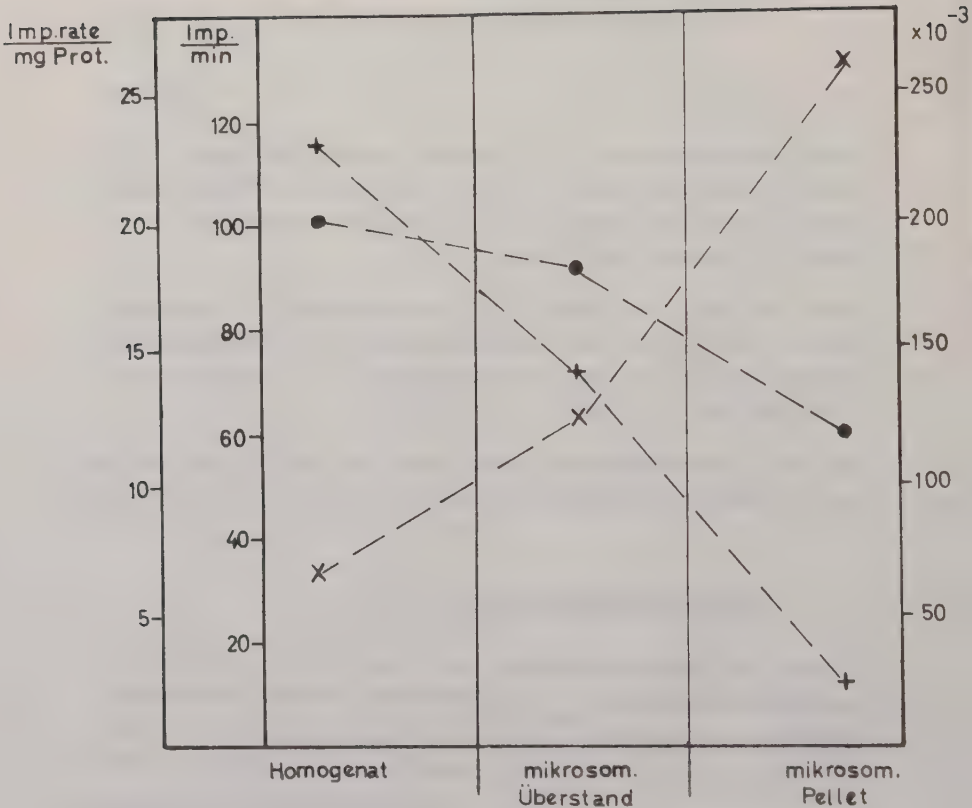


Abb. 7: Mikrosomenpräparation aus der Leber:
Proteingehalt, Impulsrate und spezifische Proteinaktivität nach Einbau von Phenylalanin- $U-^{14}C$.

Abszisse: Präparationsschritte

Ordinaten: Proteingehalt der Leber $\times 10^{-3}$
Impulsrate in Imp./min
spezifische Aktivität als Impulsrate/mg Protein

Kennzeichnung der Kurven:

- + : Proteingehalt
- : Impulsrate
- x : spezifische Aktivität

Mäuselebern im Verdünnungsverhältnis 1 : 5

n = 8 Tiere

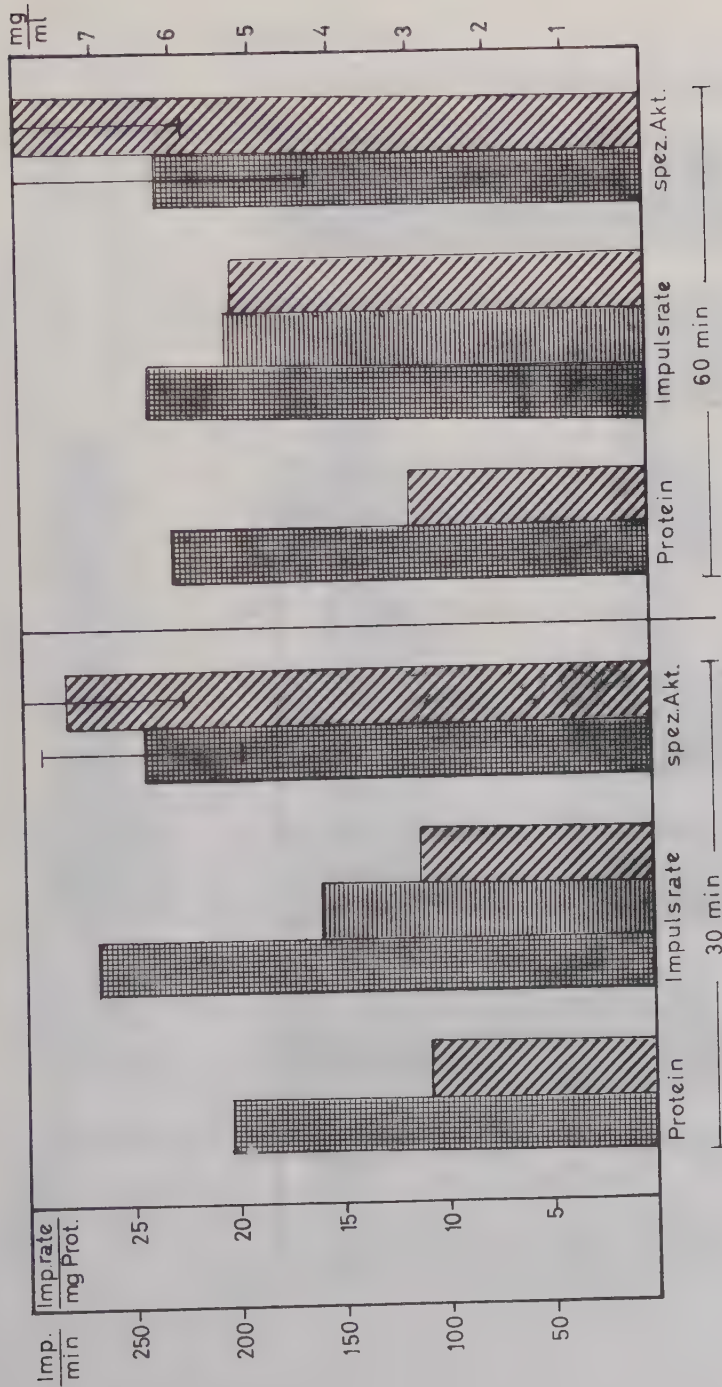


Abb. 8: Proteinkonzentration, Impulsrate und spezifische Protein-Aktivität von mikrosomalem Pellet nach Waschen mit KCl-Lösung bei 30 bzw. 60 min Markierungsdauer.

Kennzeichnung der Säulen: 1x 2x 3x

Ordinaten: Proteinkonzentration in mg/ml Mikrosomensuspension
spezifische Aktivität als Imp. rate/mg Protein der Mikrosomensuspension
Mäuselebern 1 : 5 n = 8 Tiere

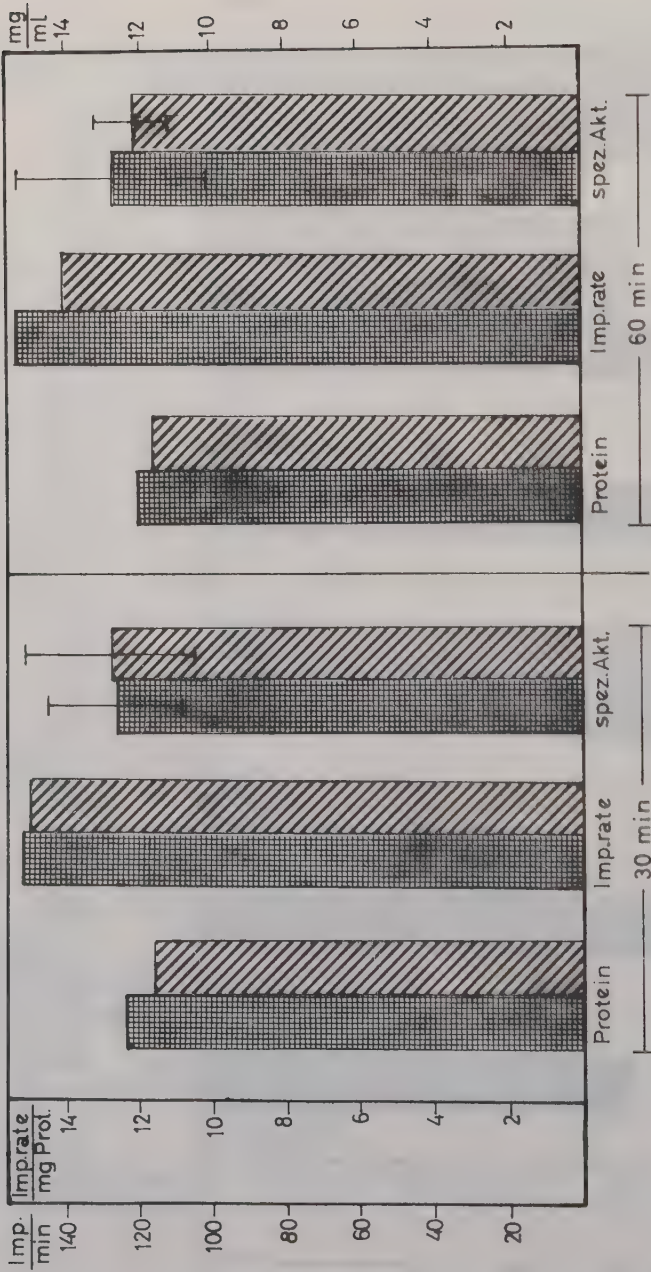


Abb. 9:

Proteinkonzentration, Impulsrate und spezifische Aktivität des Proteinanteils mikrosomaler Überstände - vor und nach Säurefällung mit anschließender 4maliger Waschung bei 30 und 60 min Markierungsdauer.

Kennzeichnung der Säulen: mikrosom. Überstand

m. ü. nach Fällung und Waschung

Ordinaten: Proteinkonz. in mg/ml m. ü., spez. Akt. als Imp. rate/mg Prot., Imp. rate als Imp./min

1: 5

n = 8 Tiere

Mäuselebern

4.2.2.3. Anilinhydroxylase

Im mikrosomalen Pellet war die spezifische Aktivität der Anilinhydroxylase um 133 % höher als im mikrosomalen Überstand, da in den isolierten Mikrosomen bei einer 74 % geringeren Proteinkonzentration nur 46 % weniger p-Aminophenol gebildet wurde (Abb. 10).

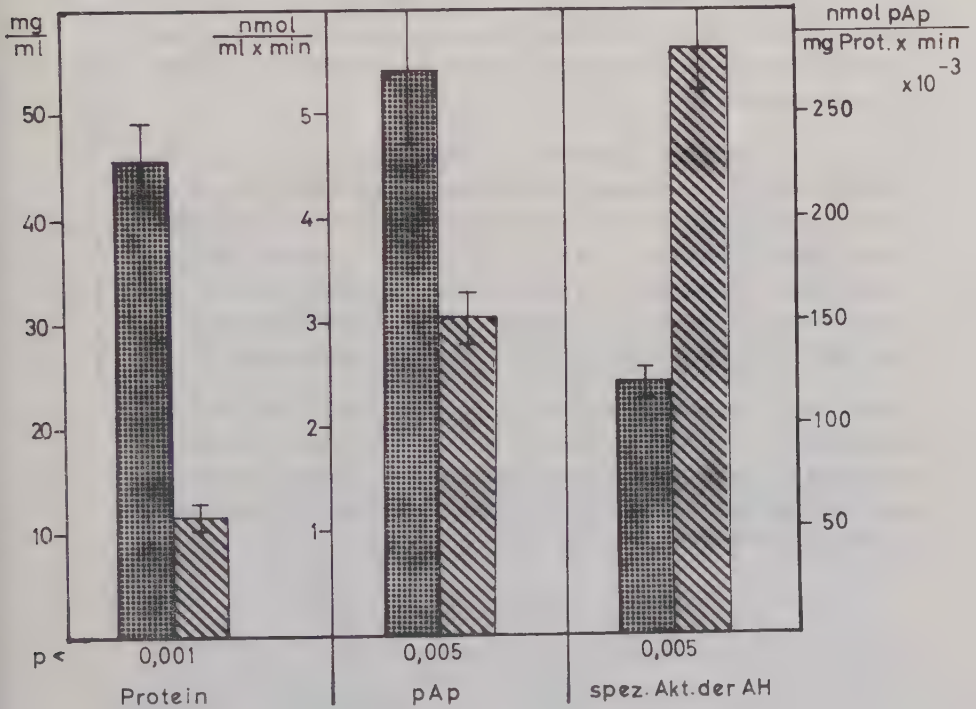


Abb. 10: Proteinkonzentration, freigesetzte Menge an p-Aminophenol und spezifische Aktivität der Anilinhydroxylase im m. Ü. und im mikrosomalen Pellet.

Kennzeichnung der Säulen:



mikrosomaler Überstand
mikrosomales Pellet

Ordinaten: Proteinkonzentration in mg/ml Mikrosomensuspension bzw. Überstand
pro min freigesetzte nmol p-Ap/ml "
spez. Akt. der AH als nmol pAp/mg Prot. x min
Mäuselebern 1 : 5 n = 6 Tiere

4.2.3. Einbau von Thymidin-2- ^{14}C

4.2.3.1. Isolierung ^{14}C -markierter DNA: Verhalten von DNA-Konzentration und Impulsrate wäh- rend der einzelnen Präparationsschritte

Die ^{14}C -Aktivität des DNA-Anteils im säuregefällten Präzipitat (gemessen im Hydrolysat des Sediments) stieg während der ersten Präparationsschritte deutlich an und verhielt sich nach mehreren Waschungen konstant (Abb. 11).

Die ^{14}C -Aktivität der Überstände war zunächst hoch, da bei der Säurefällung neben anderen niedermolekularen Bestandteilen freies und an Oligonukleotide gebundenes Thymidin-2- ^{14}C im Überstand verblieb. Dieser Anteil verschwand, wie Abb. 11 zeigt, mit zunehmender Reinigung nahezu vollständig, bis auf einen minimalen Anstieg nach dem ersten Reinigungsschritt mit Äthanol (Möglichkeit der adsorptiven Bindung einer geringen Menge von Thymidin an die Lipidfraktion).

Nukleinsäureanteile konnten in den Überständen bei 260 und 232 nm nur in Spuren nachgewiesen werden. Aus den o.e. Gründen (Oligonukleotide und freie Nukleotide im Überstand, adsorptive Bindungen) war ihr Verhalten während der einzelnen Waschungen den Aktivitätsveränderungen ähnlich (Abb. 11).

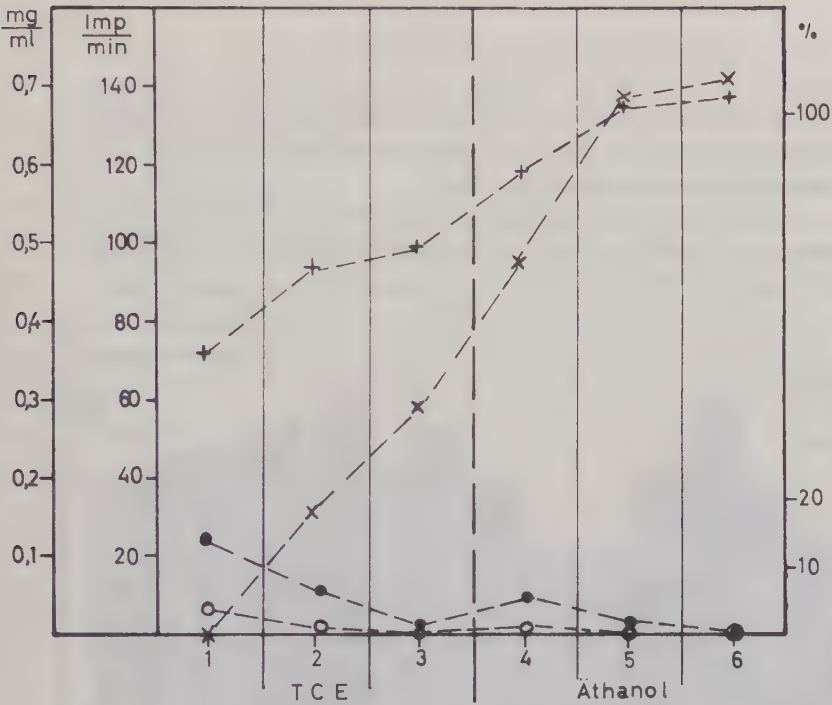


Abb. 11: DNA-Konzentration und Thymidin-2-¹⁴C-Aktivität im Hydrolysat der Sedimente und im Überstand während der einzelnen Waschungen bei DNA-Isolierung aus Leberhomogenaten.

Abszisse: Präparationsschritte:
 1. Fällung mit 6 %iger TCE
 2. und 3. Waschungen mit 6 %iger TCE
 4., 5. und 6. Waschungen in Äthanol mit 1,02 mol/l Kaliumacetat

Ordinaten: DNA-Konzentration in mg/ml Homogenat
 Nukleinsäureanteil im Überstand in % der Nukleinsäure-
 endkonzentration
 Impulsrate in Imp./min

Kennzeichnung der Kurven:
 +: DNA-Konzentration im Hydrolysat
 o: Nukleinsäureanteil im Überstand
 x: Impulsrate im Hydrolysat
 •: Impulsrate im Überstand

Mäuselebern 1:4 n = 16 Tiere

4.2.3.2. Markierungsdauer und Tracerdosierung

Bereits 30 min nach Thymidin-2- ^{14}C -Injektion hatte die DNA ihre Maximalaktivität erreicht und zeigte während der folgenden 30 min keinen merklichen Aktivitätsabfall (Abb. 12).

Eine Erhöhung der Dosis von 0,01 $\mu\text{Ci/g K.gew.}$ auf 0,02 $\mu\text{Ci/g K.gew.}$ bewirkte nur eine geringfügige, nicht dosisproportionale Steigerung der spezifischen Aktivität (Abb. 12).

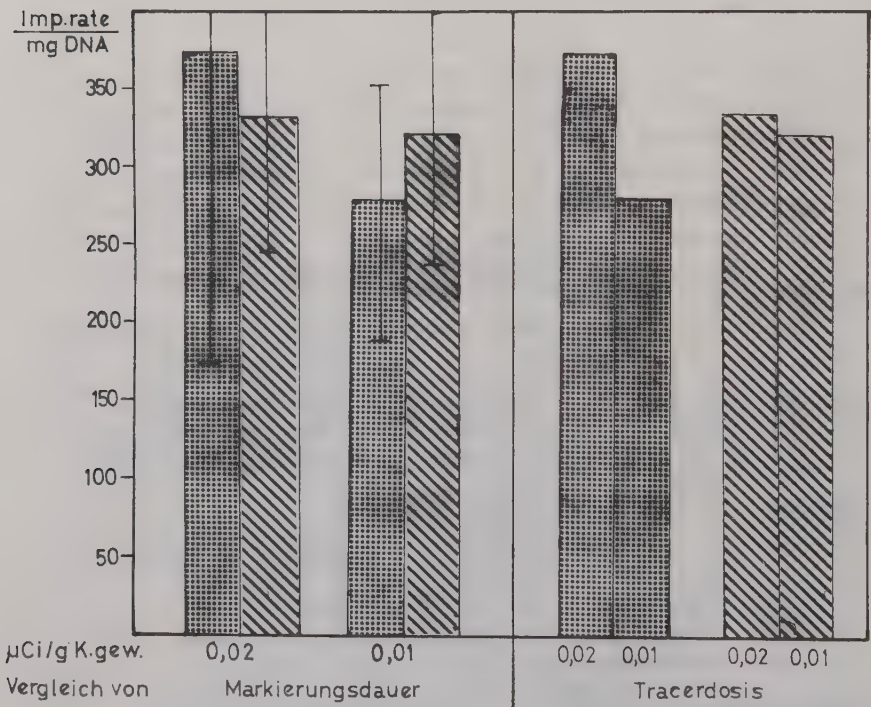


Abb. 12: Spezifische Aktivität der Leber-DNA nach i. v. -Injektion von Thymidin-2- ^{14}C bei unterschiedlicher Markierungsdauer und Tracerdosierung.

Kennzeichnung der Säulen:



Markierungsdauer 30 min

Markierungsdauer 60 min

Ordinate: spezifische Aktivität als Impulsrate/mg DNA
Mäuselebern 1 : 4 n = 16 Tiere

30 und 60 min nach Injektion von $0,02 \mu\text{Ci}$ Thymidin- $2\text{-}^{14}\text{C/g}$ K.gew. konnten im Hydrolysat noch ca. 80 % der im Homogenat gemessenen Gesamtaktivität aufgefunden werden. 12 bis 13 % der fehlenden Impulse waren als präparative Verluste in den gesammelten Überständen und im Sediment nach der Hydrolyse nachzuweisen (Abb. 13).
30 bzw. 60 min nach Gabe von $0,01 \mu\text{Ci}$ Thymidin- $2\text{-}^{14}\text{C/g}$ K.gew. war bei nahezu gleichem präparativen Verlust die Aktivität des Hydrolysats gegenüber dem Homogenat nur um 12 bzw. 6 % verringert (Abb. 13).

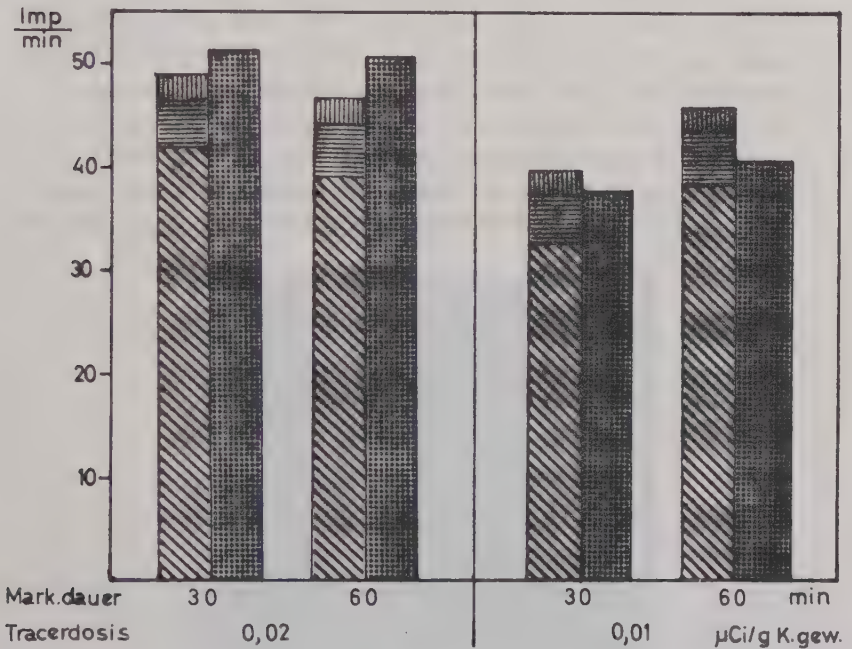
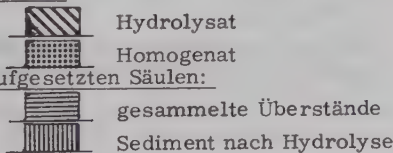


Abb. 13: Thymidin- $2\text{-}^{14}\text{C}$ -Aktivität in Leberhomogenat, Hydrolysat, gesammeltem Überstand und Sediment nach Hydrolyse
Kennzeichnung der Säulen:



Ordinate: Impulsrate in Imp./min n = 16 Tiere Leber 1 : 4

4.2.4. Hepatozytenisolierung

4.2.4.1. Morphologie und Vitalität

Abb. 14 zeigt fast ausschließlich Parenchymzellen mit einer geringen Kontamination durch zellfreie Bestandteile. Die überwiegend runden Zellen haben eine deutliche, doppelbrechende Membran, die nur vereinzelt durch Furchen eingezogen ist. In Phasenkontrastbetrachtung feststellbare Vitalitätskriterien, wie heller Zytoplasmasaum und heller Hof um die scharf erhaltene Membran (84), zeigten sich bei über 75 % der Zellen. Geringer hingegen war der Anteil an vitalen Hepatozyten (zwischen 55 und 65 % bei den einzelnen Präparationen), in die Trypanblau nicht permeieren konnte. Die Ausbeute lag somit um 10 bis 40 % unter den Werten, die für Isolierung mit Inkubation unter Carbogenbegasung beschrieben werden. Da für die folgenden Untersuchungen nur morphologisch intakte Zellen benötigt wurden, konnte auf Begasung und die daraus resultierende höhere Anzahl an lebenden Zellen verzichtet werden.

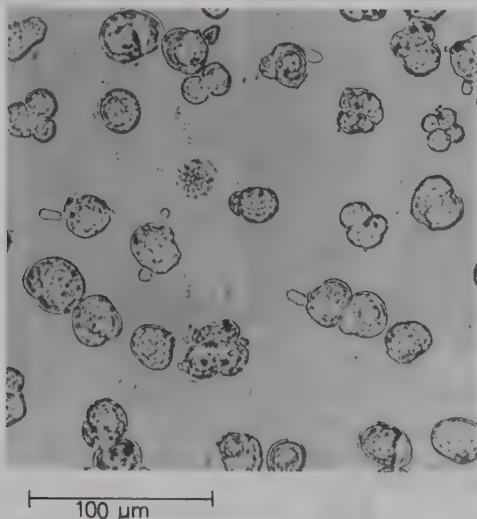


Abb. 14:

Hepatozytensuspension, resuspendiert in 1 ml Hanks-Lösung nach jeweils 1 min Zentrifugation bei 50 x g und 20 x g (x 350).

4.2.4.2. Hepatozytenausbeute in Abhängigkeit von Inkubationsdauer und Zentrifugation

4.2.4.3.1. Inkubationsdauer

Der Anstieg des Trockengewichts der Hepatozytensuspension verhielt sich während der ersten 75 min linear. Anschließend verminderte sich die Ausbeute deutlich, so daß 75 bis 90 min nach Inkubationsbeginn das Trockengewicht der Hepatozytensuspension nur mehr um 5 % (gegenüber 19 % zwischen 60 und 75 min) zunahm. Bezogen auf das Trockengewicht der Gesamtleber betrug die Ausbeute nach 75 min 4,4 % und nach 90 min 4,2 % (Abb. 15).

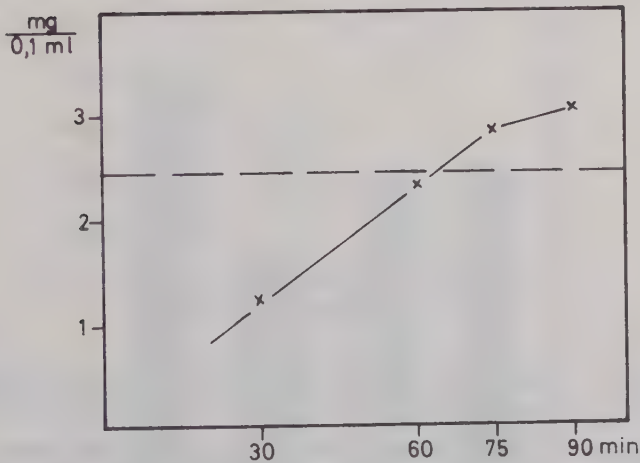


Abb. 15: Hepatozytenausbeute in Abhängigkeit von der Inkubationsdauer.

Abszisse: Inkubationsdauer in min

Ordinate: Trockengewicht von 0,1 ml der Hepatozytensuspension in mg

Die gestrichelte Linie zeigt zum Vergleich das Trockengewicht von 0,1 ml eines 1 : 20 verdünnten Gesamtleberhomogenats.

n = 10 Tiere

4.2.4.2.2. Zentrifugation

4.2.4.2.2.1. Trockengewicht

Wurde nach einer 1minütigen Zentrifugation bei $50 \times g$ nochmals 1 min bei $20 \times g$ sedimentiert, verringerte sich das Trockengewicht fast um die Hälfte. Gleichzeitig kam es dabei jedoch zu einer fast vollständigen Reinigung der Hepatozytenfraktion von überwiegend zellfreien Kontaminationen. Zusätzliche 1 min Zentrifugation bei $20 \times g$ verringerte nur die Hepatozytenausbeute, während der Reinigungsgrad kaum verbessert wurde (Abb. 16).

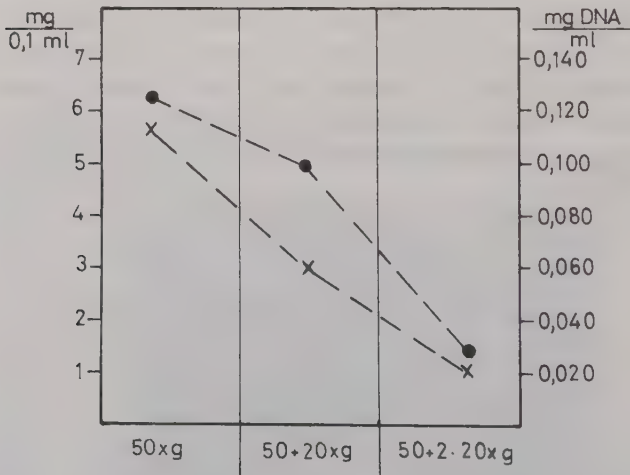


Abb. 16: Trockengewicht und DNA-Konzentration der Hepatozytensuspension während der einzelnen Zentrifugationsschritte.

Abszisse: Reihenfolge der einzelnen Zentrifugationsschritte
Ordinaten: Trockengewicht von 0,1 ml der Hepatozytensuspension in mg
DNA-Konzentration in mg/ml Hepatozytensuspension

Kennzeichnung der Kurven:
x: Trockengewicht
●: DNA-Konzentration

n = 10 Tiere

4.2.4.2.2. DNA-Konzentration und -gehalt

In Abb. 16 sind die Veränderungen der DNA-Konzentration, in Abb. 17 des DNA-Gehalts während der einzelnen Zentrifugationsschritte dargestellt. Nach der 1. Zentrifugation war der DNA-Anteil am Trockengewicht aufgrund starker Kontaminationen aus zellfreien, daher geringer DNA-haltigen Bestandteilen deutlich gegenüber dem Wert nach dem 2. Zentrifugationsschritt erniedrigt. Da bei der 3. Zentrifugation vorwiegend kernhaltige Zellfragmente im Überstand verblieben (erkenntlich auch an einer verringerten Zellzahl in der Hepatozytensuspension), kam es nur zu einer unwesentlichen Erhöhung des DNA-Anteils.

Im Vergleich zur Hepatozytensuspension besaß ein 1 : 22 verdünntes Gesamtleberhomogenat bei ungefähr gleichem Trockengewicht einen um über 30 % höheren DNA-Anteil (Abb. 17). Diese Differenz könnte als Zeichen für die Abtrennung stärker DNA-haltiger RES-Anteile der Leber von den mitotisch weniger aktiven Parenchymzellen gewertet werden. $\times 10^{-3}$

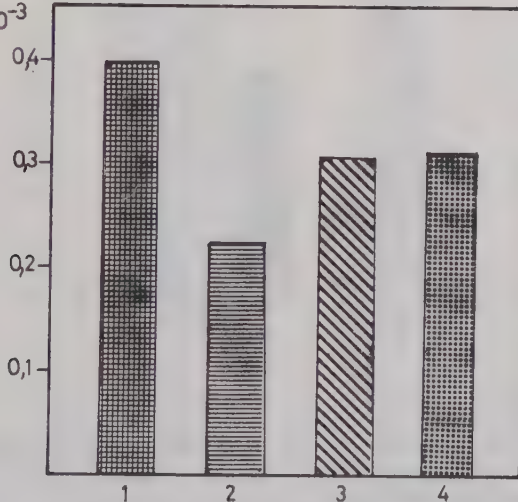


Abb. 17: DNA-Gehalt von Gesamtleberhomogenat und Hepatozytensuspension nach den einzelnen Zentrifugationen.

Kennzeichnung der Säulen:

n = 5 Tiere

1

Gesamtleberhomogenat 1 : 22

2

Hepatozytensusp. nach 50 x g

n = 9 Tiere

3

Hepatozytensusp. nach 50 + 20 x g

4

Hepatozytensusp. nach 50 + 2 x 20 x g

Ordinate:

DNA-Gehalt als DNA-Anteil am Trockengewicht $\times 10^{-3}$

4.2.4.3. DNase II-Aktivität

Die DNase II-Aktivität ist in lymphatischen Organen und Geweben mit hoher Proliferationsrate (gekennzeichnet durch intensiven DNA-Stoffwechsel und hohe Mitoserate) besonders hoch (3, 18, 105). So besitzt auch der RES-Anteil der Leber eine hohe DNase II-Aktivität. Sie liegt in den Kupffer'schen Sternzellen 3,6fach höher als in Parenchymzellen (einer nicht-regenerierenden Leber) (15). In der Hepatozytensuspension war gegenüber einem Gesamtleberhomogenat der Abbau der DNA an DNase II um 66 % verringert. Dieser Abfall könnte ebenfalls als ein Zeichen der Abtrennung des RES von den Parenchymzellen gewertet werden (Abb. 18).

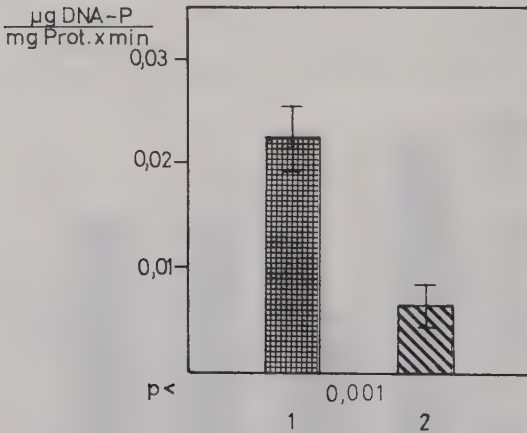


Abb. 18: DNase II-Aktivität in Gesamtleberhomogenat und Hepatozytensuspension.

Kennzeichnung der Säulen:

n = 3 Tiere	1	Gesamtleberhomogenat
n = 5 Tiere	2	Hepatozytensuspension

Ordinate: spezifische Aktivität der DNase II in pro min freigesetzte $\mu\text{g DNA-P/mg Protein}$

4.2.4.4. Einbau von Thymidin-2-¹⁴C in die DNA von Hepatozytensuspension und Zentrifugationsüberständen

In den Zentrifugationsüberständen befanden sich neben anderen z. T. zellfreien, nicht DNA-haltigen Bestandteilen die RES-Anteile der Leber. Die DNA-Konzentration der Überstände war gegenüber der Hepatozytensuspension (nicht signifikant) um 15 % erhöht (Abb. 19). Die demgegenüber 4,3fach höhere Aktivität von Thymidin-2-¹⁴C in der DNA der Überstände zeigte ergänzend zu vorangegangenen Versuchen, daß die Hepatozytensuspension überwiegend Leberbestandteile mit verhältnismäßig geringer DNA-Synthese enthielt (Abb. 19).

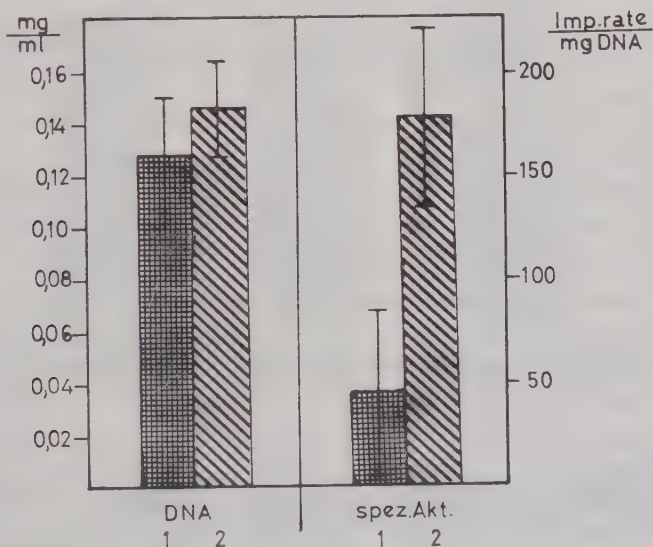


Abb. 19: Einbau von Thymidin-2-¹⁴C in die DNA von Hepatozytensuspension und vereinigten Zentrifugationsüberständen (50 + 20 x g).

Kennzeichnung der Säulen:

- 1 Hepatozytensuspension
- 2 Zentrifugationsüberstände

Ordinaten: DNA-Konz. in mg/ml Zellsuspension bzw. Überstand
spezifische Aktivität der DNA als Imp. rate/mg DNA

n = 7 Tiere

4.2.5. Tiermaterial

Während der Versuchsreihen mußten zusätzlich zu den institutseigenen, konventionell gehaltenen Mäusen Tiere aus einer auswärtigen spf-Zucht verwendet werden. Der Vergleich beider Tiergruppen zeigt, daß die Werte von relativem Organgewicht, Proteingehalt und DNase II-Aktivität des institutseigenen Stammes durchwegs höher lagen als bei den spf-Mäusen (Tab. 10).

L E B E R		rOg	Prot. $\times 10^{-3}$	DNase II	DNase II $\cdot f$
Kontr.	Insti- tutseig.	0,067 $\pm 0,0013$	13,98 $\pm 1,69$	0,168 $\pm 0,015$	0,168 $\pm 0,015$
	spf- Tiere	0,059 $\pm 0,003$	13,22 $\pm 0,69$	0,119 $\pm 0,005$	0,119 $\pm 0,005$
PVS	Insti- tutseig.	0,079 $\pm 0,015$	16,02 $\pm 3,07$	0,235 $\pm 0,019$	0,276 $\pm 0,022$
	spf- Tiere	0,059 $\pm 0,007$	13,63 $\pm 1,78$	0,173 $\pm 0,016$	0,188 $\pm 0,019$
M I L Z					
Kontr.	Insti- tutseig.	0,009 $\pm 0,003$	2,02 $\pm 0,53$	0,44 $\pm 0,09$	0,44 $\pm 0,09$
	spf- Tiere	0,004 $\pm 0,0006$	0,92 $\pm 0,13$	0,33 $\pm 0,04$	0,33 $\pm 0,04$
PVS	Insti- tutseig.	0,014 $\pm 0,004$	2,60 $\pm 0,33$	0,53 $\pm 0,01$	0,82 $\pm 0,22$
	spf- Tiere	0,007 $\pm 0,002$	1,42 $\pm 0,30$	0,35 $\pm 0,02$	0,65 $\pm 0,17$

Tab. 10: Leber- und Milzwerte konventionell gehaltener Mäuse im Vergleich zu spf-Tieren 72 h nach 3maliger Injektion von physiol. NaCl-Lösung bzw. 25 mg PVS/kg K. gew.
 Rel. Organgewicht (rOg) und Proteingehalt (als Anteil am Gesamtgewicht der Maus)
 $\mu\text{g DNA-P/mg Protein}$, korrigiert mit Faktor f (für Veränderungen des rOg).
 n = 5 Tiere je Gruppe

Berücksichtigt man die jeweilige Ausgangslage, zeigten sich hinsichtlich des Einflusses von PVS keine prinzipiellen Unterschiede (Abb. 20 und 21).

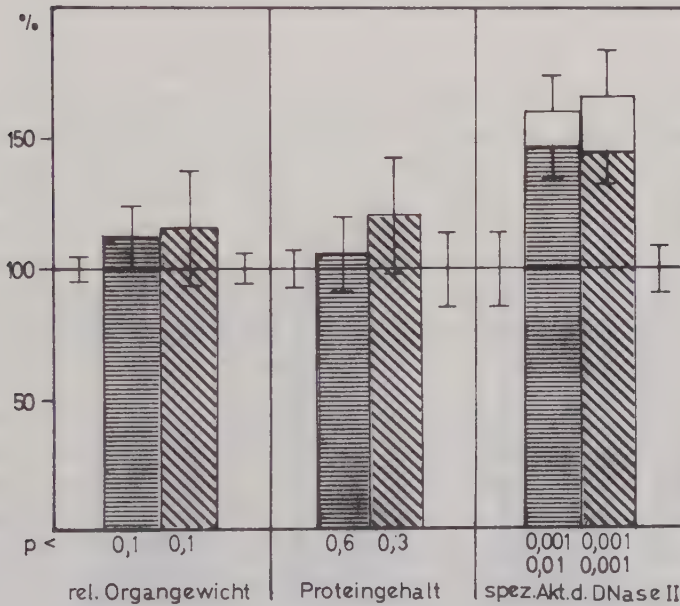


Abb. 20: Rel. Organgewicht, Proteingehalt und DNase II-Aktivität in der Leber von Mäusen aus verschiedenen Zuchten nach 3maliger Gabe von 25 mg PVS/kg K. gew.

Kennzeichnung der Säulen:



Mäuse aus institutseigener Zucht

Mäuse aus einer auswärtigen spf-Zucht

Aufgesetzte Säulen zeigen die DNase II-Aktivität nach Korrektur mit Faktor f (für Veränderungen des rel. Organgewichts).

Ordinate: Prozentuale Veränderungen unter dem Einfluß von PVS (Kontrollen = 100 %).

Alleinstehende Balken auf der Kontrolllinie zeigen die Standardabweichungen der Kontrollen.

n = 5 Tiere je Gruppe

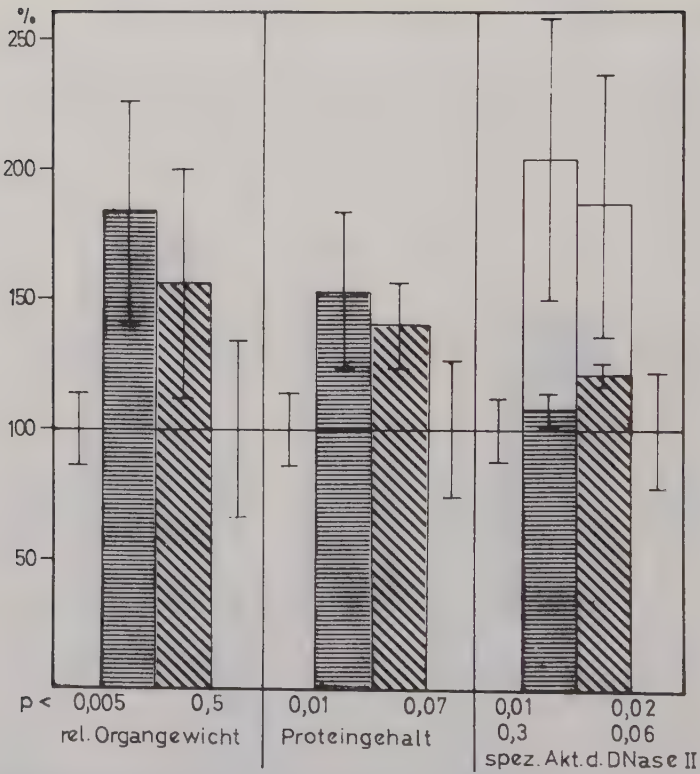


Abb. 21: Rel. Organgewicht, Proteingehalt und DNase II-Aktivität in der Milz von Mäusen aus verschiedenen Zuchten nach 3maliger Gabe von 25 mg PVS/kg K. gew.

Legende s. Abb. 20

4. 3. Ergebnisse zum Wirkungsmechanismus von Polyanionen

4. 3. 1. Gewicht, DNA-, RNA- und Proteingehalt von Leber, Milz und Thymus unter dem Einfluß von Polyanionen

4. 3. 1. 1. P V S

Durch Injektion von PVS-Lösungen entstanden an der Einstichstelle (Schwanzvene) große Hämatome, die sich nach mehrmaligen Injektionen über den ganzen Schwanz ausbreiteten und in vereinzelt Fällen zu Nekrosen führten. Nach Dosen von 50 bzw. 75 mg/kg K.gew. wiesen alle Versuchstiere starke Blutungen in die Lunge und hellbraune Lebern mit deutlicher Läppchenzeichnung auf. 48 bis 72 Stunden nach einer einmaligen Injektion von 50 bzw. 75 mg/kg K.gew. waren 30 bzw. 50 %, 24 Stunden nach 3maliger Injektion von 50 mg/kg K.gew. 60 % der Versuchstiere gestorben.

Unter dem Einfluß von PVS kam es in der Leber im allgemeinen zu einem Anstieg aller Parameter. Besonders einheitlich verhielt sich dabei der DNA-Gehalt. Die 24 h nach der letzten von 3 PVS-Injektionen gemessene Zunahme des DNA-Gehalts nahm im Dosisbereich von 12,5 bis 37,5 mg/kg K.gew. mit steigender Dosis ab. Wurde am 3. Tag nach der letzten PVS-Injektion gemessen, hatten 37,5 mg PVS/kg K.gew. eine deutlich schwächere Wirkung als 25 und 50 mg/kg K.gew. (Tab. 11).

Die Wirkungen von PVS auf die Milz waren analog. Die Tendenz zu einer Rückbildung der Veränderungen war hier durchwegs früher erkennbar als in der Leber. Bis zum 2. Aufarbeitungszeitpunkt waren die untersuchten Parameter auch hier nach hohen PVS-Dosen weniger stark abgefallen als nach kleineren Dosen (Tab. 12).

Soweit PVS das Thymus-Gewicht signifikant beeinflusste (im unteren Dosisbereich von 12,5 bis 37,5 mg/kg K.gew.), kam es zu einer maximal 40 %igen Gewichtsabnahme. Einmalige PVS-Gaben (50 und 75 mg/kg K.gew.) verminderten den Proteingehalt zum früheren Versuchszeitpunkt, während sich 8 Tage nach Versuchsbeginn bei Do-

sen von 12,5 bis 25,0 mg/kg K.gew. rund 60 bzw. 90 %ige Zunahmen ergaben. Weitgehend gegenläufig verhielt sich der DNA-Gehalt. - Wurde am 3. Tag nach der letzten von 3 PVS-Injektionen gemessen, bewirkte die Substanz im unteren Dosisbereich eine Zunahme, nach höherer Dosierung eine Abnahme des Nukleinsäuregehalts (Tab. 13).

Tab. 11, 12 und 13:

Verhalten von relativem Organgewicht, Protein-, DNA- und RNA-Gehalt in Leber, Milz und Thymus nach 1maliger und 3maliger Injektion von PVS in Abhängigkeit von Dosis und Aufarbeitungszeitpunkt.

Prozentuale Angaben der Veränderungen bezogen auf den Kontroll-durchschnitt (= 100 %).

(n.b. = Wert wurde nicht bestimmt

* = signifikante Veränderungen mit $p < 0,05$

** = signifikante Veränderungen mit $p < 0,005$)

n = 5 Tiere je Gruppe

1mal.Inj. von	12,5	25	37,5	50	75
3. Tag p. i.					
	mg/kg K. gew.				
rel. Org.gew.	+ 14,7*	+ 14,9*	n.b.	+ 3,9	+ 9,2
Protein	n.b.	n.b.	n.b.	- 20,1*	- 5,4
DNA	n.b.	n.b.	n.b.	+ 8,3	+ 38,8**
RNA	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.
8. Tag p. i.					
rel. Org.gew.	+ 6,9	+ 15,8	n.b.	+ 24,9**	+ 20,3**
Protein	+ 15,0*	+ 11,9	n.b.	- 5,1	+ 30,1**
DNA	- 6,2	- 6,2	n.b.	+ 49,2**	+ 78,3**
RNA	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.
3mal.Inj.					
1. Tag p. ii.					
rel. Org.gew.	+ 29,3*	+ 17,5*	+ 12,5	n.b.	n.b.
Protein	+ 41,8*	+ 6,2	+ 21,1*	n.b.	n.b.
DNA	+ 100,0**	+ 65,9**	+ 35,9*	n.b.	n.b.
RNA	+ 32,0*	+ 19,2*	+ 1,2	n.b.	n.b.
3. Tag p. ii.					
rel. Org.gew.	+ 21,7*	+ 7,1	+ 18,4*	- 7,5	n.b.
Protein	+ 21,5*	+ 12,6	+ 3,9	+ 15,9	n.b.
DNA	+ 11,2	+ 83,6**	+ 41,9**	+ 99,5**	n.b.
RNA	+ 1,2	+ 120,2**	+ 6,1	+ 93,9**	n.b.

Tab. 11: Veränderungen in der L e b e r unter dem Einfluß von P V S.

1mal. Inj. von	12,5	25	37,5	50	75
3. Tag p. i.	mg/kg K. gew.				
rel. Org. gew.	+ 139,6**	+ 97,6**	n. b.	+ 27,8	+ 27,8
Protein	n. b.	n. b.	n. b.	+ 80,3*	+ 90,9*
DNA	n. b.	n. b.	n. b.	+ 57,1*	+ 60,0*
RNA	n. b.	n. b.	n. b.	n. b.	n. b.
8. Tag p. i.					
rel. Org. gew.	- 10,5	- 1,1	n. b.	+ 45,8	+ 16,2
Protein	+ 3,8	- 1,1	n. b.	+ 33,7	+ 20,7
DNA	- 33,4	- 36,4	n. b.	+ 35,4	+ 38,0
RNA	n. b.	n. b.	n. b.	n. b.	n. b.
3mal. Inj.					
1. Tag p. ii.					
rel. Org. gew.	+ 118,6**	+ 58,7**	+ 72,6*	n. b.	n. b.
Protein	+ 38,8	+ 12,2	+ 95,5**	n. b.	n. b.
DNA	+ 99,1*	+ 54,2	+ 223,5**	n. b.	n. b.
RNA	+ 31,8	- 17,4	+ 9,2	n. b.	n. b.
3. Tag p. ii.					
rel. Org. gew.	+ 41,6*	+ 57,7*	+ 47,4	+ 22,7	n. b.
Protein	+ 35,2	+ 89,9**	+ 41,6	+ 48,9*	n. b.
DNA	+ 49,7*	+ 151,1**	+ 68,6*	+ 76,8**	n. b.
RNA	+ 62,8*	+ 67,2**	+ 71,2*	+ 82,6*	n. b.

Tab. 12: Veränderungen in der Milz unter dem Einfluß von P V S.

1mal. Inj. von	12,5	25	37,5	50	75
3. Tag p. i.	mg/kg K. gew.				
rel. Org. gew.	- 43,2**	- 27,9*	n. b.	- 13,3	- 4,6
Protein	n. b.	n. b.	n. b.	- 33,6*	- 34,7*
DNA	n. b.	n. b.	n. b.	- 10,5	+ 16,6
RNA	n. b.	n. b.	n. b.	n. b.	n. b.
8. Tag p. i.					
rel. Org. gew.	+ 8,0	+ 6,0	n. b.	+ 9,8	+ 9,8
Protein	+ 62,9**	+ 88,8**	n. b.	- 8,5	+ 14,1
DNA	- 15,4	- 30,7*	n. b.	- 21,1*	- 30,0*
RNA	n. b.	n. b.	n. b.	n. b.	n. b.
3mal. Inj.					
1. Tag p. ii.					
rel. Org. gew.	- 17,6	+ 30,6	- 15,5	n. b.	n. b.
Protein	+ 73,7**	+ 227,0**	+ 32,3*	n. b.	n. b.
DNA	+ 1,8	+ 13,5	- 32,3*	n. b.	n. b.
RNA	- 7,8	- 9,4	- 52,4**	n. b.	n. b.
3. Tag p. ii.					
rel. Org. gew.	- 7,6	- 21,7*	- 22,0*	- 23,0	n. b.
Protein	- 4,8	- 21,7*	- 8,1	- 20,0	n. b.
DNA	+ 32,2*	+ 53,6**	- 40,6*	+ 22,3	n. b.
RNA	+ 26,4	+ 33,2*	- 33,3*	- 10,1	n. b.

Tab. 13: Veränderungen im T h y m u s unter dem Einfluß von P V S.

4.3.1.2. D N A

3 Tage nach 3maliger i.v. Injektion von DNA in Dosen von 25 bis 100 mg/kg K.gew. hatte sich der DNA-Gehalt der L e b e r um 10 bis 20 % erhöht, während der Proteingehalt um maximal 18 und der RNA-Gehalt um 22 bis 28 % abgenommen hatten. - Weniger einheitliche Ergebnisse ergaben sich nach 1maliger Injektion des Polyanions sowie zu einem früheren Versuchszeitpunkt (Tab. 14).

Zu signifikanten Veränderungen des Protein- und Nukleinsäure-Gehalts in der M i l z kam es erst nach 3maliger i.v. Injektion von DNA in einer Dosis von 100 mg/kg K.gew. - 1 bis 3 Tage nach der letzten Injektion hatten sich der Protein-, DNA- und RNA-Gehalt um maximal 44, 53 bzw. 112 % erhöht (Tab. 15).

3 Tage nach der letzten von 3 DNA-Injektionen entsprechend einer Dosis von 100 mg/kg K.gew. hatten sich Gewicht, Protein- und Nukleinsäure-Gehalt des T h y m u s um 39,6 (Gewicht) bis 146 % (RNA) erhöht. Wurde DNA nur einmal verabfolgt, führten eine Dosis von 25 mg/kg K.gew. erst nach 8 Tagen, Dosen von 50 - 100 mg/kg K.gew. bereits während der ersten 24 Stunden zu einer signifikanten Zunahme von Organgewicht und DNA-Gehalt (Tab. 16).

Tab. 14, 15 und 16:

Verhalten von relativem Organgewicht, Protein-, DNA- und RNA-Gehalt in Leber, Milz und Thymus nach 1maliger und 3maliger Injektion von D N A in Abhängigkeit von Dosis und Aufarbeitungszeitpunkt.

Prozentuale Angaben der Veränderungen, bezogen auf den Kontroll-durchschnitt (= 100 %).

(n.b. = Wert wurde nicht bestimmt

* = signifikante Veränderungen mit $p < 0,05$

** = signifikante Veränderungen mit $p < 0,005$)

n = 5 Tiere je Gruppe

1mal. Inj. von	25	50	100
3. Tag p.i.	mg/kg K.gew.		
rel. Org.gew.	- 0,9	+ 3,5	+ 4,9
Protein	+ 13,8*	+ 15,4*	+ 5,3
DNA	- 29,0**	+ 9,7*	- 5,7
RNA	n.b.	n.b.	n.b.
8. Tag p.i.			
rel. Org.gew.	+ 1,1	- 2,1	- 13,0*
Protein	- 2,7	+ 1,1	+ 4,1
DNA	- 14,0*	+ 3,0	+ 15,7*
RNA	n.b.	n.b.	n.b.
3mal. Inj.			
1. Tag p. ii.			
rel. Org.gew.	- 1,4	- 0,6	- 4,6
Protein	+ 2,4	- 3,8	- 14,3*
DNA	- 2,7	- 3,9	- 9,1
RNA	- 7,3	+ 32,3*	- 15,1*
3. Tag p. ii.			
rel. Org.gew.	- 18,4*	- 21,0*	+ 12,9
Protein	- 14,4*	- 17,8*	- 0,4
DNA	+ 13,8	+ 10,0*	+ 21,1*
RNA	- 21,8**	- 23,4**	- 27,6**

Tab. 14: Veränderungen in der L e b e r unter dem Einfluß von D N A.

1mal. Inj. von	25	50	100
3. Tag p. i.	mg/kg K. gew.		
rel. Org. gew.	+ 0,6	- 2,8	- 3,5
Protein	+ 14,0	- 26,7	- 3,1
DNA	+ 1,2	+ 10,6	- 10,6
RNA	n. b.	n. b.	n. b.
8. Tag p. i.			
rel. Org. gew.	+ 16,6	+ 19,9	- 20,0
Protein	+ 17,4	+ 16,9	- 15,2
DNA	- 25,5	- 0,2	- 29,6
RNA	n. b.	n. b.	n. b.
3mal. Inj.			
1. Tag p. ii.			
rel. Org. gew.	+ 11,1	+ 44,3	+ 26,3*
Protein	+ 12,2	+ 27,9	+ 44,0*
DNA	- 5,0	+ 43,7	+ 45,7*
RNA	- 11,0	+ 25,1	+ 112,0**
3. Tag p. ii.			
rel. Org. gew.	+ 7,8	- 1,6	+ 17,9
Protein	+ 14,1	+ 38,5*	+ 44,4*
DNA	- 7,8	+ 6,7	+ 53,5**
RNA	- 17,9	+ 22,0	- 2,1

Tab. 15: Veränderungen in der Milz unter dem Einfluß von
DNA.

1mal.Inj. von	25	50	100
3. Tag p.i.	mg/kg K. gew.		
rel. Org.gew.	+ 1,1	+ 16,9	+ 60,5*
Protein	+ 10,7	- 32,3*	- 0,1
DNA	+ 13,9	+ 40,7*	+ 95,6**
RNA	n.b.	n.b.	n.b.
8. Tag p.i.			
rel. Org.gew.	+ 40,3*	+ 15,6	- 0,6
Protein	+ 11,0	- 19,7	- 9,3
DNA	+ 40,3*	- 48,7*	- 16,6
RNA	n.b.	n.b.	n.b.
3mal.Inj.			
1. Tag p. ii.			
rel. Org.gew.	+ 1,8	- 11,0	- 11,1
Protein	- 23,0*	+ 65,1*	+ 5,2
DNA	+ 4,2	- 17,8	- 11,8
RNA	+ 11,3	- 1,9	- 11,1
3. Tag p. ii.			
rel. Org.gew.	- 5,7	- 7,7	+ 39,6*
Protein	+ 5,9	+ 7,2	+ 132,0**
DNA	- 36,1*	- 4,7	+ 136,0**
RNA	- 20,2	+ 3,9	+ 146,0**

Tab. 16: Veränderungen im T h y m u s unter dem Einfluß von
D N A.

4.3.1.3. Poly(rI)·Poly(rC)

Soweit Poly(rI)·Poly(rC) in der L e b e r signifikante Veränderungen des Proteingehalts bewirkte (in Dosen von 0,25 und 0,50 mg/kg K.gew.), ergab sich eine Abnahme. Im mittleren Dosisbereich (bei 0,50 mg/kg K.gew.) verminderte sich der DNA-Gehalt der Leber geringgradig, während 8 Tage nach 1maliger Gabe von 1,0 mg/kg K.gew. eine rund 70 %ige Zunahme zu verzeichnen war. Wurde das Polyanion 1malig verabfolgt, war der 8 Tage später gemessene RNA-Gehalt der Leber um 20 bis 40 % erhöht. Wiederholte Gaben bewirkten einen Abfall des RNA-Gehaltes (Tab. 17).

In der M i l z führte Poly(rI)·Poly(rC) nach einer 1maligen Dosis von 1,0 mg/kg K.gew. zu einer ausgeprägten Zunahme aller untersuchten Parameter. Wesentlich geringer waren die Veränderungen unter dem Einfluß kleinerer Dosen. - Durch 3malige Injektion von Poly(rI)·Poly(rC) wurden der Protein- und Nukleinsäure-Gehalt der Milz im gewählten Dosisbereich umgekehrt dosisproportional vermindert (Tab. 18).

Soweit 1malige Injektionen von Poly(rI)·Poly(rC) im T h y m u s zu signifikanten Veränderungen führten, ergab sich eine Verminderung von Protein-, DNA- und RNA-Gehalt. Wurde Poly(rI)·Poly(rC) mehrmals verabreicht, stieg der Proteingehalt im oberen Dosisbereich an; für den DNA- und RNA-Gehalt deuteten sich zum früheren Versuchszeitpunkt eine Abnahme, zum späteren Zeitpunkt im mittleren und unteren Dosisbereich eine Zunahme des DNA-Gehalts an (Tab. 19).

Tab. 17, 18 und 19:

Verhalten von relativem Organgewicht, Protein-, DNA- und RNA-Gehalt in Leber, Milz und Thymus nach 1maliger und 3maliger Injektion von Poly(rI)·Poly(rC) in Abhängigkeit von Dosis und Aufarbeitungszeitpunkt.

Prozentuale Angaben der Veränderungen bezogen auf den Kontroll-durchschnitt (= 100 %).

(n.b. = Wert wurde nicht bestimmt

* = signifikante Veränderungen mit $p < 0,05$

** = signifikante Veränderungen mit $p < 0,005$)

n = 5 Tiere je Gruppe

1mal.Inj. von	0,25	0,50	1,0
3. Tag p. i.	mg/kg K.gew.		
rel. Org.gew.	- 10,0	- 9,8	+ 7,4
Protein	- 32,7**	- 29,4**	- 11,3
DNA	- 12,0	- 18,2	+ 14,3
RNA	- 1,0	+ 10,7	- 14,3
8. Tag p. i.			
rel. Org.gew.	+ 10,4	- 2,8	+ 12,0
Protein	+ 0,7	- 4,6	- 5,8
DNA	- 3,7	- 19,4*	+ 71,6**
RNA	+ 39,8*	+ 27,8*	+ 20,7*
3mal.Inj.			
1. Tag p. ii.			
rel. Org.gew.	+ 3,9	+ 3,5	- 0,6
Protein	- 3,9	- 13,9*	- 8,9
DNA	- 9,0	- 9,1	- 8,1
RNA	- 36,1**	- 40,4**	- 30,0**
3. Tag p. ii.			
rel. Org.gew.	- 7,7	- 0,7	- 6,2
Protein	+ 2,1	- 6,1	- 9,3
DNA	+ 11,2	- 24,1*	+ 15,7
RNA	- 16,9*	- 17,9*	- 29,2*

Tab. 17: Veränderungen in der Leber unter dem Einfluß von Poly(rI) · Poly(rC).

1mal.Inj. von	0,25	0,50	1,0
3. Tag p. i.	mg/kg K. gew.		
rel. Org.gew.	+ 33,0*	+ 30,7	+ 223,0**
Protein	+ 9,4	+ 15,8	+ 221,0**
DNA	+ 57,2**	+ 21,0	+ 117,9**
RNA	+ 34,3*	+ 38,6	+ 137,1**
8. Tag p.i.			
rel. Org.gew.	- 24,1	- 24,8	+ 32,7
Protein	n.b.	n.b.	n.b.
DNA	+ 38,4*	+ 18,7	+ 93,6**
RNA	- 22,3	+ 21,4	+ 24,3
3mal.Inj.			
1. Tag p. i.			
rel. Org.gew.	+ 21,2	+ 49,6	+ 17,1
Protein	+ 27,8	+ 22,0	+ 3,7
DNA	- 17,0	+ 7,2	+ 4,9
RNA	- 8,9	+ 1,1	+ 15,2
3. Tag p. ii.			
rel. Org.gew.	- 49,3*	- 17,6	- 11,7
Protein	- 61,2**	- 29,1*	- 19,1
DNA	- 47,1**	- 19,5	+ 5,9
RNA	- 56,6**	- 42,5*	- 18,2

Tab. 18: Veränderungen in der Milz unter dem Einfluß von Poly(rI) · Poly(rC).

1mal.Inj. von	0,25	0,50	1,0
3. Tag p. i.	mg/kg K.gew.		
rel. Org.gew.	- 21,2	- 9,5	- 17,2
Protein	+ 4,2	- 1,1	- 18,9
DNA	+ 3,2	+ 6,6	- 20,1
RNA	- 34,5	- 32,9	- 31,2*
8. Tag p. i.			
rel. Org.gew.	- 0,3	+ 14,5	- 5,5
Protein	- 46,3*	- 37,7*	- 43,5*
DNA	- 33,9*	- 15,2	- 1,8
RNA	- 16,5	+ 8,6	- 13,9
3mal.Inj.			
1. Tag p. ii.			
rel. Org.gew.	+ 21,9	+ 3,9	+ 18,0
Protein	- 6,8	- 14,2	+ 27,9*
DNA	- 21,3	- 20,8	- 16,9
RNA	- 31,1*	- 35,2*	- 35,9*
3. Tag p. ii.			
rel. Org.gew.	- 3,4	+ 17,9	- 12,8
Protein	- 25,1	+ 51,6**	+ 8,0
DNA	+ 45,2*	+ 13,8	+ 7,7
RNA	+ 30,1	- 12,0	- 7,2

Tab. 19: Veränderungen im Thymus unter dem Einfluß von Poly(rI) · Poly(rC).

4.3.2. Untersuchungen am Reaktionsmaximum

Im Bereich des jeweiligen Reaktionsmaximums der Polyanionen, dessen Dosis- und Zeitabhängigkeit durch die Untersuchungen unter (4.3.1.) ermittelt worden war, wurden an der *Leber* die Aktivität der Desoxyribonuklease II (als Komponente des DNA-Stoffwechsels) und die Anilinhydroxylase-Aktivität (zum Ausschluß von Induktionsphänomenen allgemeiner Art) bestimmt.

Beide Enzyme dienten aufgrund ihrer bevorzugten Lokalisation zugleich als "Leitenzyme" für die beiden bei der Fragestellung interessierenden Gewebsanteile der Leber, das RES und die Parenchymzellen:

Die DNase II befindet sich überwiegend in Zellen des RES (158), während die Anilinhydroxylase Teil des hauptsächlich auf die Leberzelle beschränkten, multifaktoriellen, gemischtfunktionellen Oxidasesystems für den Fremdstoffmetabolismus ist (p. 384 in 20).

Zur Messung der Proteinsynthese der Leber wurde der In vivo-Einbau von Phenylalanin-U- ^{14}C in eine Mikrosomenpräparation erfaßt. - Die DNA-Synthese ergab sich aus dem Einbau von Thymidin-2- ^{14}C in Leber-DNA. - Von beiden Parametern wurde u.a. Aufschluß darüber erwartet, ob die festgestellten Veränderungen des Protein- und DNA-Gehalts unter Polyanioneneinwirkung (s. dazu Teil 4.3.1.) durch veränderte Syntheserate oder exogene Einflüsse (z. B. Lymphozytenimmigration) bedingt waren. Die Messungen der Einbauraten erfolgten zu einem früheren Versuchszeitpunkt, da eine Erhöhung der Syntheserate dem Anstieg von Protein- und DNA-Gehalt zeitlich vorausgeht. Der Einbau von Thymidin-2- ^{14}C wurde daneben auch noch am 2. Versuchszeitpunkt gemessen.

Zur Gewebslokalisierung von Veränderungen der DNA-Syntheserate der Leber unter dem Einfluß von Polyanionen wurde schließlich der Einbau von Thymidin-2- ^{14}C in die DNA der isolierten Hepatozyten und der bei den Präparationen erhaltenen vereinigten Zentrifugationsüberstände untersucht. Diese enthalten neben anderen Komponenten den Hauptanteil des RES.

In der M i l z wurde als einziger Parameter die DNase II-Aktivität gemessen.

4.3.2.1. P V S

4.3.2.1.1. Reaktionsmaximum

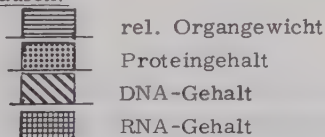
Wie Tab. 11 zeigt, lag in dem für PVS gewählten Dosisbereich das Reaktionsmaximum der L e b e r bei 3maliger Applikation von 25 mg/kg K.gew. . Diese Dosierung führte ohne deutlichen Anstieg von Organgewicht und Proteingehalt zu starken Erhöhungen innerhalb der Nukleinsäurefraktion. Sie beliefen sich bei der DNA auf 83,6 % und bei der RNA auf 120,2 % (Abb. 22).

Der Nukleinsäuregehalt zeigte auch in der M i l z signifikante Zunahmen: DNA um 151 %, RNA um 67 %. Hiermit waren im Gegensatz zur Leber ein 90 %iger Anstieg des Proteingehalts und eine Organvergrößerung um mehr als die Hälfte verbunden (Tab. 12 und Abb. 22).

Bei deutlichem Abfall von relativem Organgewicht und Proteingehalt um jeweils 21,7 % war auch im T h y m u s der DNA- bzw. RNA-Gehalt, und zwar um 53,6 bzw. 33,2 %, erhöht (Tab. 13 und Abb. 22).

Abb. 22: Rel. Organgewicht, Protein-, DNA- und RNA-Gehalt von Leber, Milz und Thymus 72 h nach 3maliger Gabe von 25 mg PVS/kg K.gew.

Kennzeichnung der Säulen:



Ordinate: Prozentuale Veränderungen unter dem Einfluß von PVS (Kontrollen = 100 %). Alleinstehende Balken auf der Kontrolllinie zeigen die höchste Standardabweichung der Kontrollen.

(* = $p < 0,05$)

(** = $p < 0,005$)

n = 5 Tiere je Gruppe

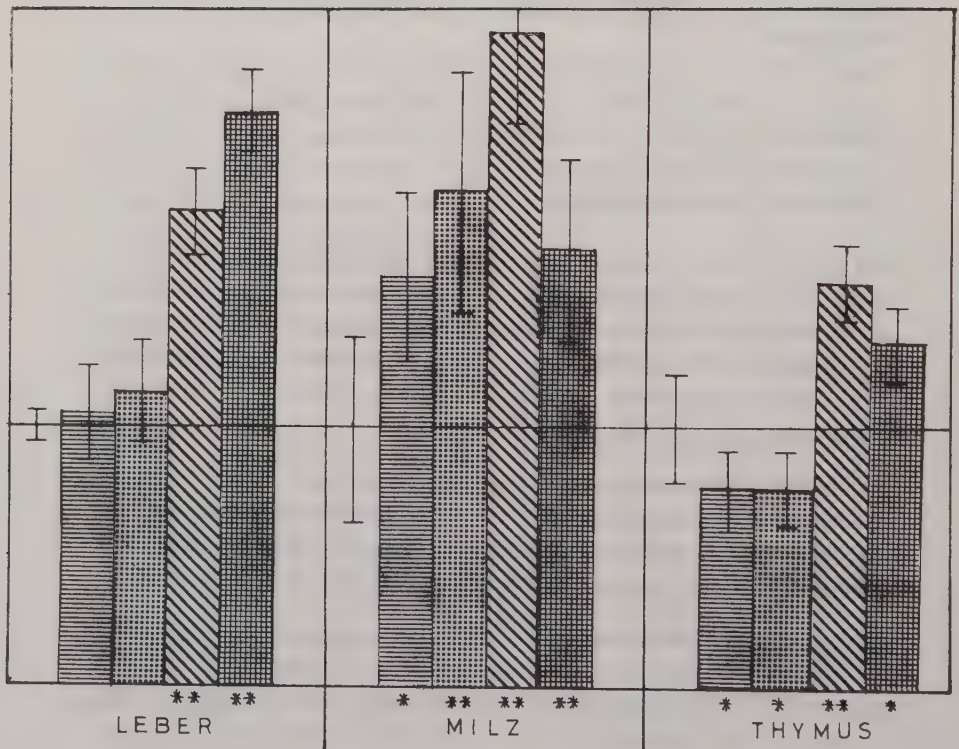


Abb. 22

4.3.2.1.2. DNase II-Aktivität

1. Leber

Durch die DNase II von Kontrollebern wurden in 60 min 83,8 μg DNA-P pro 1,0 ml Homogenat (1 : 25) freigesetzt. Unter dem Einfluß von PVS erhöhte sich dieser Wert bei nicht signifikantem Anstieg des relativen Organgewichts und des Proteingehalts auf 115 μg DNA-P/ml Homogenat. Dadurch vergrößerte sich die spezifische Aktivität der DNase II um 40 % und unter Berücksichtigung der Veränderungen des rel. Organgewichts um 65 % über den Kontrolldurchschnitt (Abb. 23).

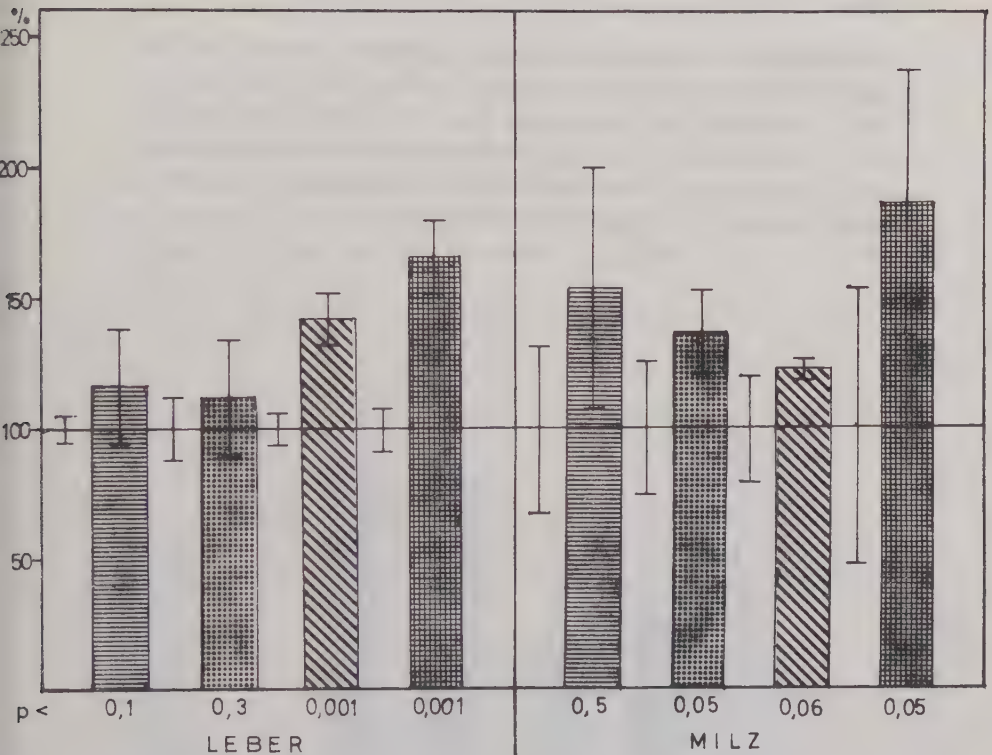


Abb. 23: DNase II-Aktivität, rel. Organgewicht und Proteingehalt in Leber und Milz 3 Tage nach 3maliger Gabe von 25 mg PVS/kg K. gew.

Kennzeichnung der Säulen:



rel. Organgewicht

Proteingehalt

spez. Aktivität der DNase II

spez. Aktivität der DNase II · f

Ordinate: Prozentuale Veränderungen unter dem Einfluß von PVS (Kontrollen = 100 %). Alleinstehende Balken auf der Kontrolllinie zeigen die Standardabweichung der Kontrollen.

n = 5 Tiere je Gruppe

2. Milz

Gleichzeitig erhöhte sich in der Milz die spezifische Aktivität der DNase II von 0,44 bei den Kontrollen auf 0,53 $\mu\text{g DNA-P/mg Protein} \cdot \text{min}$ nach PVS-Behandlung. Unter Anrechnung einer über 55 %igen Erhöhung des rel. Organgewichts erfuhr die spezifische Aktivität ('f) eine weitere Steigerung um 65 % auf insgesamt 86 % über den Wert des Kontrolldurchschnitts (Abb. 23).

4.3.2.1.3. Anilinhydroxylase-Aktivität

Unter dem Einfluß von PVS verminderte sich die Anilinhydroxylase-Aktivität. Während 15 min Inkubation wurden anstelle von 66,8 nur mehr 41,1 nmol p-Aminophenol (p-Ap)/ml mikrosomalen Überstands(m. Ü.) gebildet. Daraus resultierte ein (47 %iger) Abfall der spezifischen Aktivität von 0,175 auf 0,092 nmol p-Ap/min·mg Protein des m. Ü., der unter Berücksichtigung einer 19 %igen Erhöhung des relativen Organgewichts insgesamt 41 % (spez. Aktivität · f) betrug (Abb. 24).

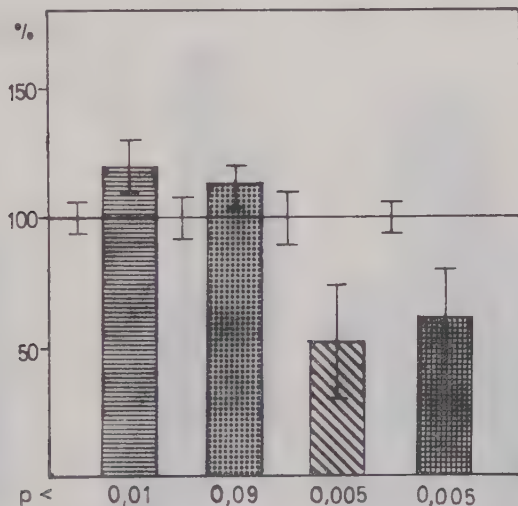


Abb. 24: Anilinhydroxylase-Aktivität, rel. Organgewicht und Proteingehalt der Leber 72 h nach 3maliger Gabe von 25 mg PVS/kg K. gew.

Kennzeichnung der Säulen:

-  rel. Organgewicht
-  Proteingehalt
-  spez. Aktivität der AH
-  spez. Aktivität der AH · f

Ordinate: Prozentuale Veränderungen unter dem Einfluß von PVS (Kontrollen = 100 %). Alleinstehende Balken auf der Kontrolllinie zeigen die Standardabweichung der Kontrollen.

n = 5 Tiere je Gruppe

4.3.2.1.4. Einbau von Phenylalanin-U-¹⁴C

Bei gleichbleibender Proteinkonzentration vergrößerte sich im m. Ü. aus Leberhomogenaten die Phenylalanin-U-¹⁴C-Aktivität nach PVS-Applikation um ca. 30 %. Dadurch erhöhte sich die spezifische Aktivität von 51,4 bei unbehandelten auf 71,1 Imp./min · mg Protein des m. Ü. bei PVS-behandelten Tieren (Abb. 25).

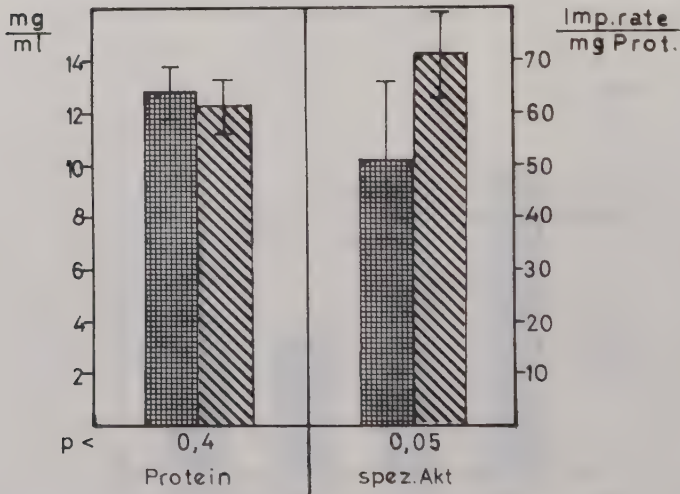


Abb. 25: Phenylalanin-U-¹⁴C-Aktivität und Proteinkonzentration im m. Ü. der Leber 24 h nach 3maliger Gabe von 25 mg PVS/kg K.gew.

Kennzeichnung der Säulen:



Kontrollen

PVS-behandelte Tiere

Ordinaten: Proteinkonzentration in mg/ml m. Ü.
spez. Aktivität als Imp.rate/mg Protein des m. Ü.
n = 6 Tiere je Gruppe

4.3.2.1.5. Thymidin-2-¹⁴C-Einbau

24 h nach der letzten von 3 PVS-Injektionen waren DNA-Konzentration und Impulsrate im Nukleinsäurenhydrolysat gegenüber den Kontrollen nahezu unverändert. Während der nächsten 48 h stiegen beide Parameter ungleich stark an, so daß 72 h p. ii. aus einer 15 %igen Erhöhung der DNA-Konzentration und einer 50 %igen Zunahme der Impulsrate eine um über 39 % über den Kontrolldurchschnitt erhöhte spezifische Aktivität der DNA resultierte (Abb. 26).

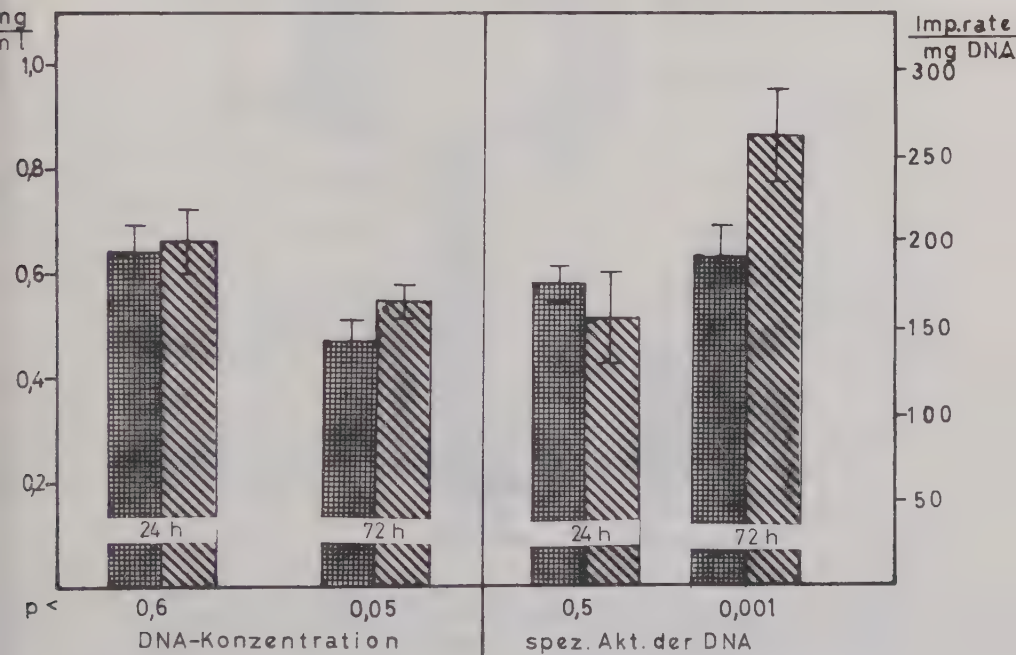


Abb. 26: Einbau von Thymidin-2-¹⁴C in die DNA und DNA-Konzentration 24 und 72 h nach 3maliger Gabe von 25 mg PVS/kg K. gew.

Kennzeichnung der Säulen:



Kontrollen

PVS-behandelte Tiere

Ordinaten: DNA-Konzentration in mg/ml Homogenat
spezifische Aktivität der DNA als Imp.rate/mg DNA

n = 6 Tiere je Gruppe

4.3.2.1.6. Thymidin-2-¹⁴C-Einbau in die DNA von Hepatozyten und Zentrifugationsüberständen

In der Hepatozytensuspension war 72 h nach der letzten Injektion der DNA-Anteil am Trockengewicht gegenüber den Kontrollen um 45 % verringert, während gleichzeitig die spezifische Aktivität auf das 16fache des Wertes des Vergleichsdurchschnitts angestiegen war (Abb. 27).

Wie Abb. 28 zeigt, kam es zum selben Zeitpunkt in den vereinigten 50 + 20 x g-Überständen bei 38 %igem Anstieg des DNA-Gehalts zu einer ca. 6fachen Erhöhung der spezifischen Aktivität.

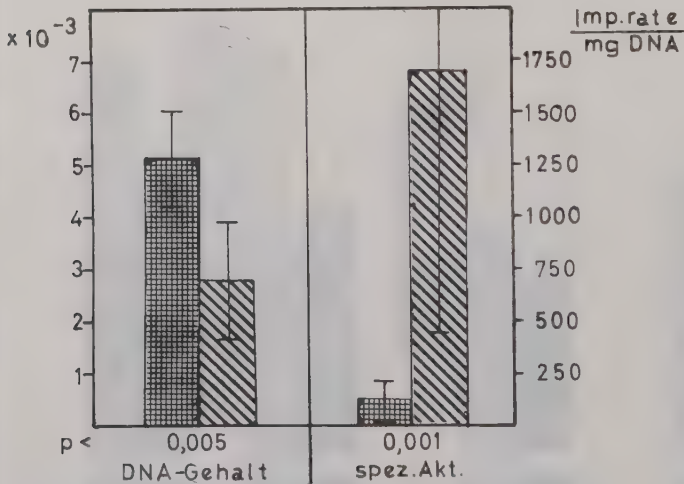


Abb. 27: DNA-Gehalt und Thymidin-2-¹⁴C-Einbau in die DNA von Hepatozyten 72 h nach 3maliger Gabe von 25 mg PVS/kg K. gew.

Kennzeichnung der Säulen:



Kontrollen

PVS-behandelte Tiere

Ordinaten: DNA-Gehalt als Anteil der DNA am Trockengew. x 10⁻³
spezifische Aktivität der DNA als Imp.rate/mg DNA
n = 7 Tiere je Gruppe

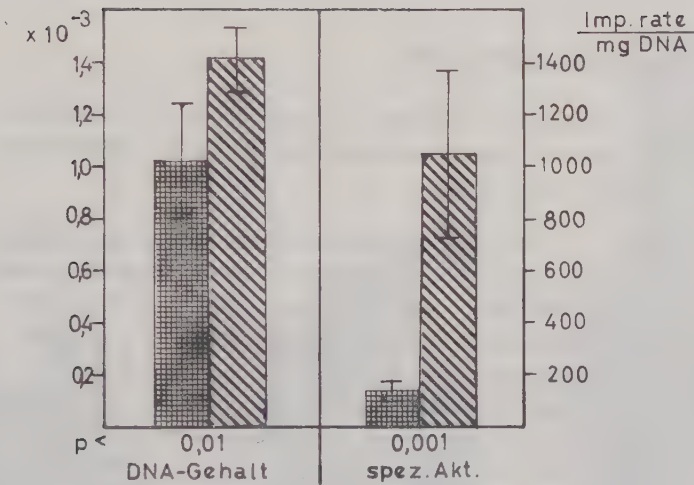


Abb. 28: DNA-Gehalt und Thymidin-2-¹⁴C-Einbau in den Zentrifugationsüberständen 72 h nach 3maliger Gabe von 25 mg PVS/kg K. gew.

Kennzeichnung der Säulen:



Kontrollen

PVS-behandelte Tiere

Ordinaten: DNA-Gehalt als Anteil der DNA am Trockengew. $\times 10^{-3}$
spez. Aktivität der DNA als Imp. rate/mg DNA

n = 7 Tiere je Gruppe

4.3.2.2. D N A

4.3.2.2.1. Reaktionsmaximum

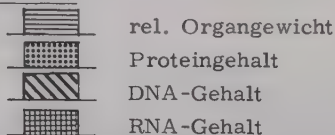
Unter der Wirkung von DNA zeigten sich deutliche Reaktionen gleichzeitig und an allen untersuchten Organen erst 72 h nach wiederholter Applikation von 100 mg/kg K.gew. (Tab. 14 mit 16).

In der *L e b e r* - sie reagierte im Gegensatz zu Milz und Thymus bei mehrmaliger Verabreichung über den gesamten Dosisbereich hinweg deutlich auf DNA-Gabe - erreichten die dosisproportional ablaufenden Veränderungen des Nukleinsäuregehalts bei der o.e. Dosierung ihre höchsten Werte. So kam es ohne Veränderungen von rel. Organgewicht und Proteingehalt (beide Parameter waren bei 25 und 50 mg/kg K.gew. deutlich erniedrigt) zu einer Zunahme des DNA-Gehalts um 21 % und einer Abnahme des RNA-Gehalts um 27,6 % (Abb. 29). In der *M i l z* waren bei nicht (mehr) signifikanter Erhöhung des rel. Organgewichts um 18 % der Proteingehalt um 44,4 % und der DNA-Gehalt um 53,5 % über den Kontrolldurchschnitt angestiegen. Der RNA-Gehalt war nahezu unverändert (Abb. 29).

Als einziges der untersuchten Organe zeigte der *T h y m u s* unter den gleichen Versuchsbedingungen bei allen Parametern signifikante Zunahmen, die sich allerdings nicht gewichtskonform verhielten. Bei nur 40 %iger Zunahme des rel. Organgewichts waren Protein-, DNA- und RNA-Gehalt um 132, 136 bzw. 146 % erhöht (Abb. 29).

Abb. 29: Rel. Organgewicht, Protein-, DNA- und RNA-Gehalt von Leber, Milz und Thymus 72 h nach 3maliger Gabe von 100 mg DNA/kg K.gew.

Kennzeichnung der Säulen:



Ordinate: Prozentuale Veränderungen unter dem Einfluß von DNA (Kontrollen = 100 %). Alleinstehende Balken auf der Kontrolllinie zeigen die höchste Standardabweichung der Kontrollen.

(* = $p < 0,05$
** = $p < 0,005$
n = 5 Tiere je Gruppe

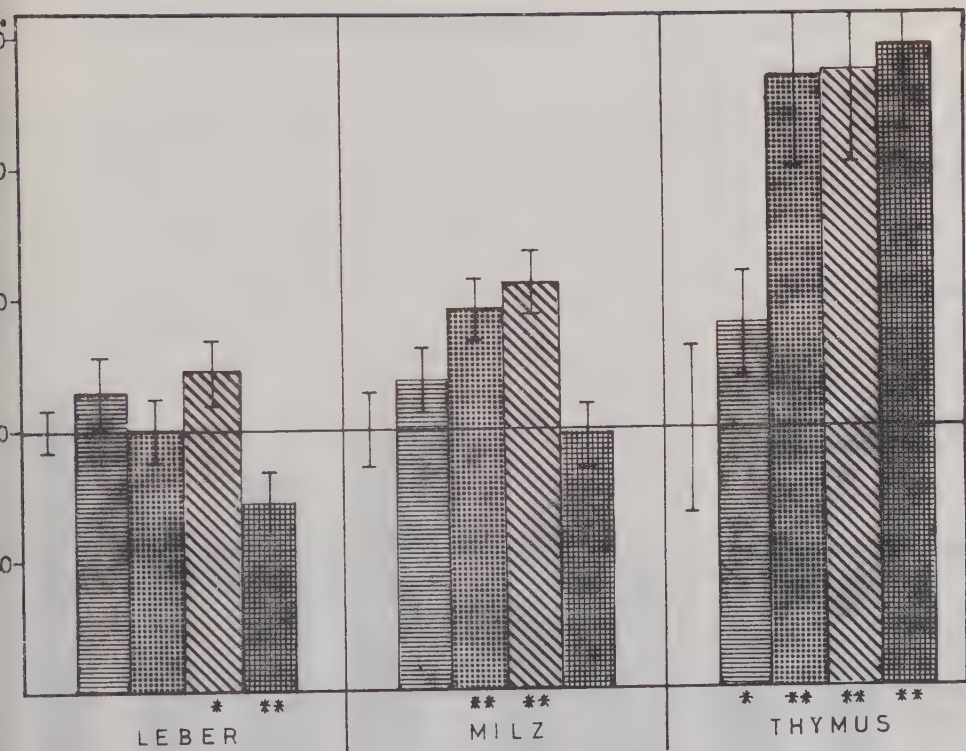


Abb. 29

4.3.2.2.2. DNase II-Aktivität

1. Leber

Nach Verabreichung von DNA kam es in der Leber zu nicht signifikantem Abfall der DNase II-Aktivität um 13,2 % unter Berücksichtigung des rel. Organgewichts, das um 13,4 % abnahm, um 22,1 % (Abb. 30).

2. Milz

72 h nach der letzten DNA-Injektion war in der Milz die DNase II-Aktivität um 10,2 % erhöht. Gleichzeitig hatte der Proteingehalt um

27,6 % zugenommen. Unter Anrechnung der Veränderungen des rel. Organgewichts, das um 45 % anstieg, betrug der Aktivitätszuwachs 54,5 % (Abb. 30).

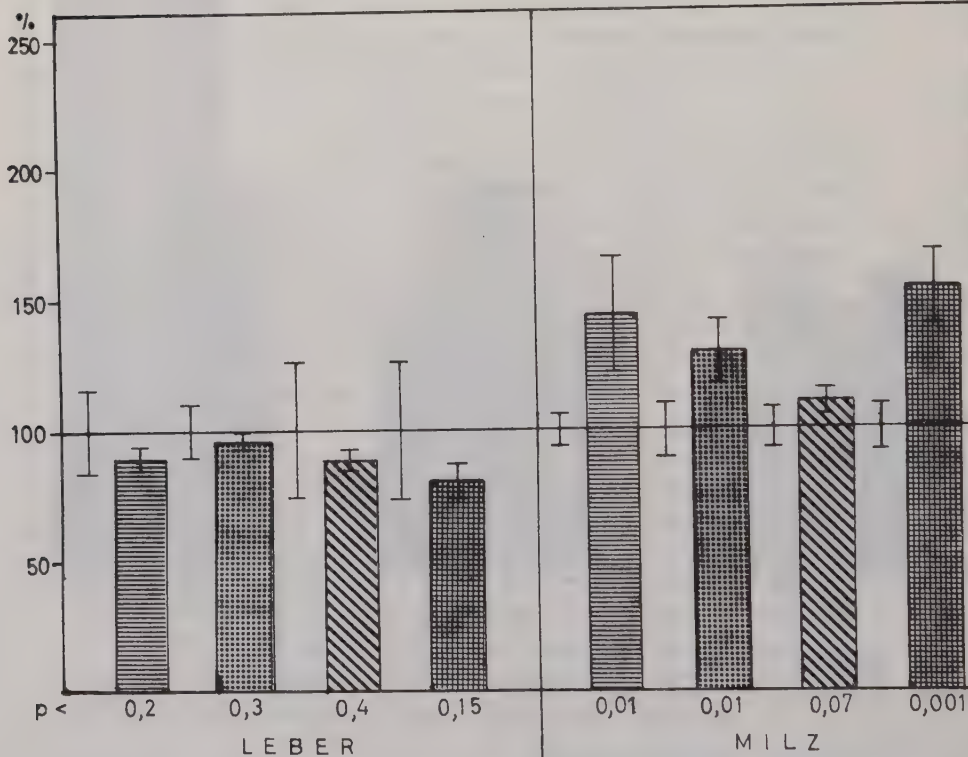


Abb. 30: DNase II-Aktivität, rel. Organgewicht und Proteingehalt in Leber und Milz 3 Tage nach 3maliger Gabe von 100 mg DNA/kg K. gew.

Kennzeichnung der Säulen:

-  rel. Organgewicht
-  Proteingehalt
-  spez. Akt. der DNase II
-  spez. Akt. der DNase II · f

Ordinate: Prozentuale Veränderungen unter dem Einfluß von DNA (Kontrollen = 100 %). Alleinstehende Balken auf der Kontrolllinie zeigen die Standardabweichung der Kontrollen.

n = 5 Tiere je Gruppe

4.3.2.2.3. Anilinhydroxylase-Aktivität

Wurde der m. Ü. von Kontrolltieren und DNA-behandelten Mäusen 15 min lang inkubiert, wurden im letzteren Fall durch die Anilinhydroxylase 22 nmol weniger p-Ap gebildet als im Vergleichsdurchschnitt. Bei gleichzeitigem Anstieg des Proteingehalts um 17 % ergab sich ein Abfall der spezifischen Aktivität um 29 % von 0,348 auf 0,248 nmol p-Ap/min · mg Protein des m. Ü., der sich nach Korrektur der 7 %igen Zunahme des rel. Organgewichts auf 23,5 % verringerte (Abb. 31).

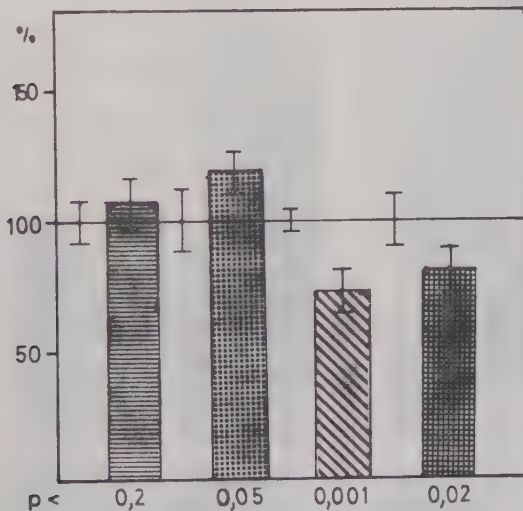
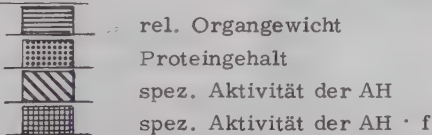


Abb. 31: Anilinhydroxylase-Aktivität, rel. Organgewicht und Proteingehalt der Leber 72 h nach 3maliger Gabe von 100 mg DNA/kg K. gew.

Kennzeichnung der Säulen:



Ordinate: Prozentuale Veränderungen unter dem Einfluß von DNA (Kontrollen = 100 %). Alleinstehende Balken auf der Kontrolllinie zeigen die Standardabweichung der Kontrollen.

n = 5 Tiere je Gruppe

4.3.2.2.4. Phenylalanin-U- 14 C-Einbau

DNA-Behandlung bewirkte im mikrosomalen Überstand der Leber einen Anstieg der spezifischen 14 C-Aktivität von 64,3 auf 87,9 Imp./min · mg Protein (Abb. 32).

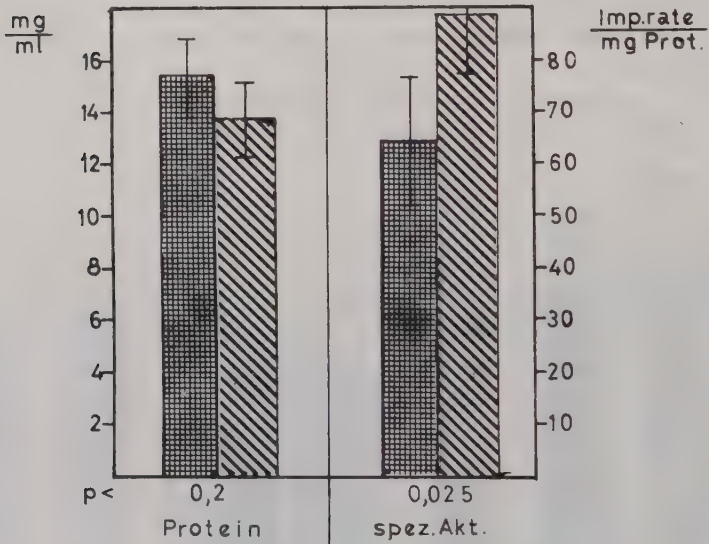


Abb. 32: Proteinkonzentration und Phenylalanin-U- 14 C-Aktivität in m.Ü. der Leber 24 h nach 3maliger Gabe von 100 mg DNA/kg K. gew.

Kennzeichnung der Säulen:



Kontrollen

DNA-behandelte Tiere

Ordinaten: Proteinkonzentration in mg/ml m.Ü.
spez. Aktivität als Imp. rate/mg Protein des m.Ü.

n = 6 Tiere je Gruppe

4.3.2.2.5. Thymidin-2-¹⁴C-Einbau

24 h nach der letzten von 3 DNA-Injektionen waren noch keine deutlichen Veränderungen von DNA-Konzentration und Impulsrate feststellbar. Erst nach 72 h zeigte sich ein Anstieg der DNA-Konzentration um 17 % und der Impulsrate um 50 %, woraus sich eine Erhöhung der spezifischen Aktivität der DNA von 168,6 auf 230,4 Imp./min·mg DNA ergibt (Abb. 33).

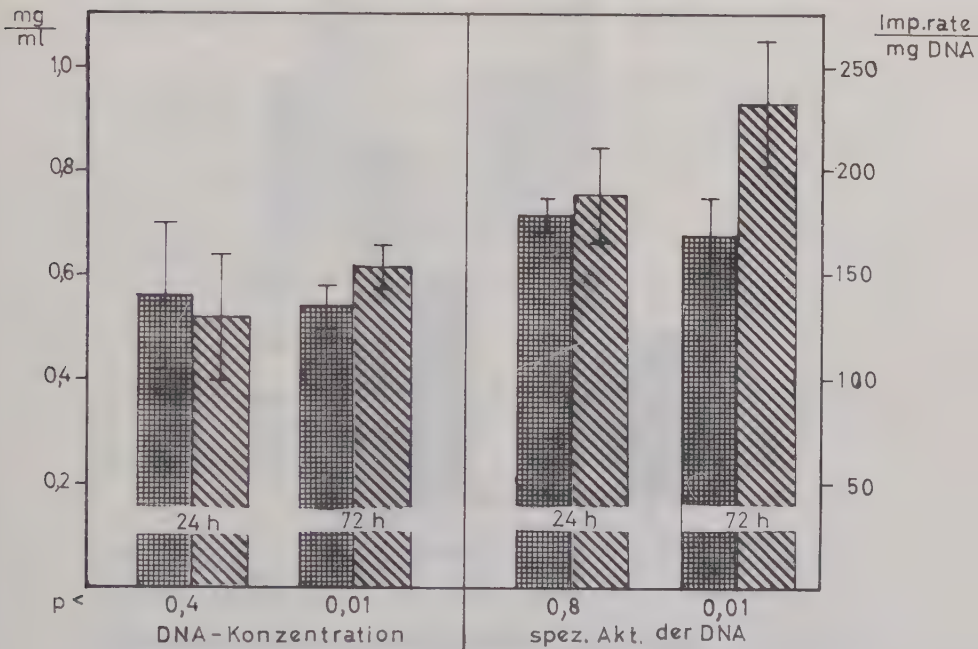


Abb. 33: Einbau von Thymidin-2-¹⁴C in die DNA und DNA-Konzentration in der Leber 24 und 72 h nach 3maliger Gabe von 100 mg DNA/kg K. gew.

Kennzeichnung der Säulen:



Kontrollen

DNA-behandelte Tiere

Ordinaten: DNA-Konzentration in mg/ml Homogenat
spez. Aktivität der DNA als Imp. rate / mg DNA

n = 6 Tiere je Gruppe

4.3.2.2.6. Thymidin-2-¹⁴C-Einbau in die DNA von Hepatozyten und Zentrifugationsüberständen

Unter dem Einfluß von DNA veränderten sich in den Hepatozyten weder der DNA-Anteil am Trockengewicht noch die spezifische Aktivität der DNA signifikant gegenüber den Kontrollen (Abb. 34).

Demgegenüber erhöhten sich in den gepoolten Zentrifugationsüberständen der DNA-Gehalt um 104 %, die Impulsrate um 232 % und (daraus resultierend) die spezifische Aktivität der DNA um 136 % (Abb. 35).

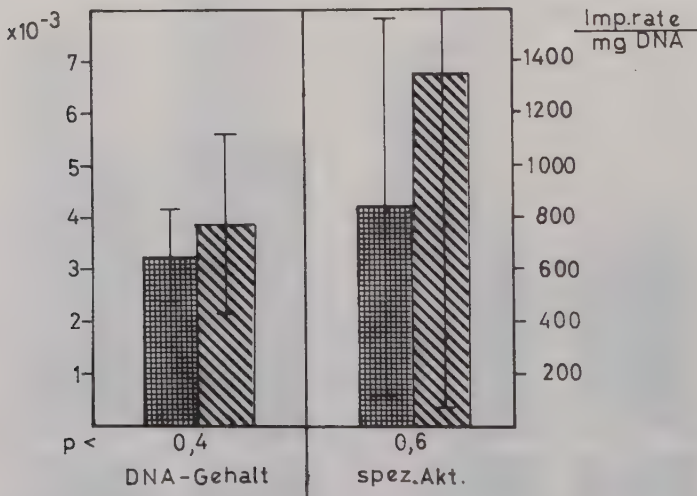


Abb. 34: Thymidin-2-¹⁴C-Einbau und DNA-Gehalt in Hepatozyten 72 h nach 3maliger Gabe von 100 mg DNA/kg K. gew.

Kennzeichnung der Säulen:



Kontrollen



DNA-behandelte Tiere

Ordinaten: DNA-Gehalt als Anteil der DNA am Trockengewicht x 10⁻³
spez. Aktivität der DNA als Imp.rate/mg DNA

n = 6 Tiere je Gruppe

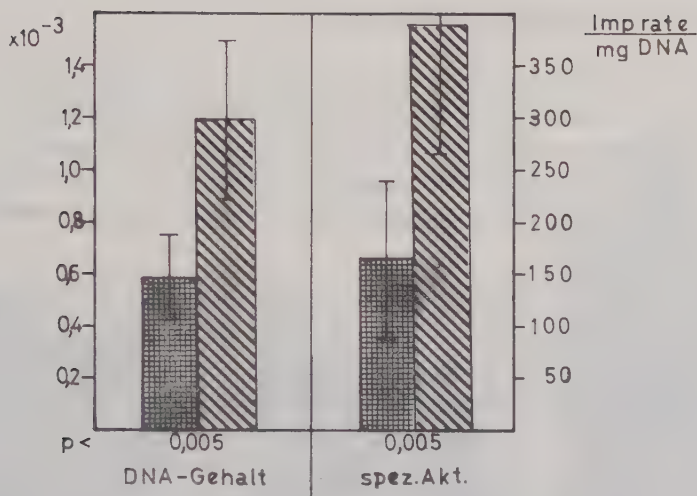


Abb. 35: Thymidin-2-¹⁴C-Einbau und DNA-Gehalt der gepoolten 50 + 20 x g-Überstände 72 h nach 3maliger Gabe von 100 mg DNA/kg K. gew.

Kennzeichnung der Säulen:



Kontrollen



DNA-behandelte Tiere

Ordinaten: DNA-Gehalt als Anteil der DNA am Trockengew. $\cdot 10^{-3}$
spez. Aktivität der DNA als Imp. rate/mg DNA

n = 6 Tiere je Gruppe

4.3.2.3. Poly(rI) · Poly(rC)

4.3.2.3.1. Reaktionsmaximum

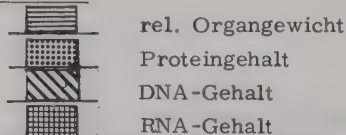
72 h nach chronischer Applikation von 0,25 und 0,50 mg Poly(rI) · Poly(rC)/kg K.gew. zeigten sich Reaktionen an allen untersuchten Organen. Nach der höheren Dosis waren im Gegensatz zur Milz an Leber und Thymus umfangreichere Wirkungen feststellbar (Tab. 17 mit 19), so daß alle weiteren Untersuchungen in dieser Dosierungsstufe ausgeführt wurden.

In der **L e b e r** war der Nukleinsäuregehalt um 24,1 % (DNA) bzw. 17,9 % (RNA) erniedrigt. Zu Veränderungen von Organgewicht und Proteingehalt kam es nicht (Abb. 36). Zum gleichen Zeitpunkt wiesen alle untersuchten Parameter in der **M i l z** Abnahmen auf, am deutlichsten der Protein- und RNA-Gehalt (29,1 bzw. 42,5 %), nicht signifikant das rel. Organgewicht (17,6 %) und der DNA-Gehalt (19,5 %). Die letzten beiden Parameter hatten sich allerdings an diesem Organ bei 0,25 mg/kg K.gew. wesentlich stärker verändert als bei höherer Dosierung (Abb. 36).

Im Thymus waren nach 0,50 mg Poly(rI) · Poly(rC)/kg K.gew. alle Werte - RNA-Gehalt ausgenommen - erhöht. Signifikante Zunahmen zeigte jedoch nur der Proteingehalt (51,6 %) (Abb. 36).

Abb. 36: Rel. Organgewicht, Protein-, DNA- und RNA-Gehalt von Leber, Milz und Thymus 72 h nach 3maliger Gabe von 0,50 mg Poly(rI) · Poly(rC)/kg K.gew.

Kennzeichnung der Säulen:



Ordinate: Prozentuale Veränderungen unter dem Einfluß von Poly(rI) · Poly(rC) (Kontrollen = 100 %). Alleinstehende Balken auf der Kontrolllinie zeigen die höchste Standardabweichung der Kontrollen.

(* = p < 0,05
 ** = p < 0,005)
 n = 5 Tiere je Gruppe

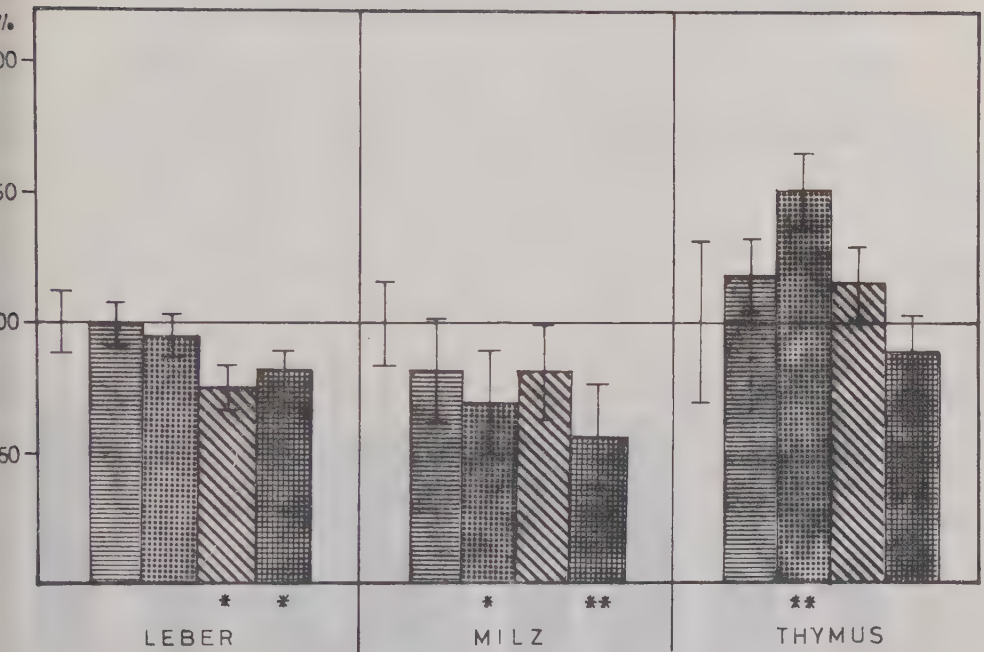


Abb. 36

4.3.2.3.2. DNase II-Aktivität

1. Leber

Ohne signifikante Veränderungen von rel. Organgewicht und Proteingehalt verringerte sich die spezifische Aktivität der DNase II in der Leber unter dem Einfluß von Poly(rI)·Poly(rC) gegenüber dem Vergleichsmittel um 13 % von 0,146 auf 0,127 $\mu\text{g DNA-P/min} \cdot \text{mg Protein}$ und unter Berücksichtigung einer 3,2 %igen Abnahme des rel. Organgewichts auf insgesamt 15,5 % (Abb. 37).

2. Milz

In der Milz zeigten sich unter dem Einfluß von Poly(rI)·Poly(rC) keine signifikanten Veränderungen der DNase II-Aktivität. Ein geringfügig-

ger Anstieg der spez. Aktivität war unter Berücksichtigung der Abnahmen des rel. Organgewichts nicht mehr gegeben (Abb. 37).

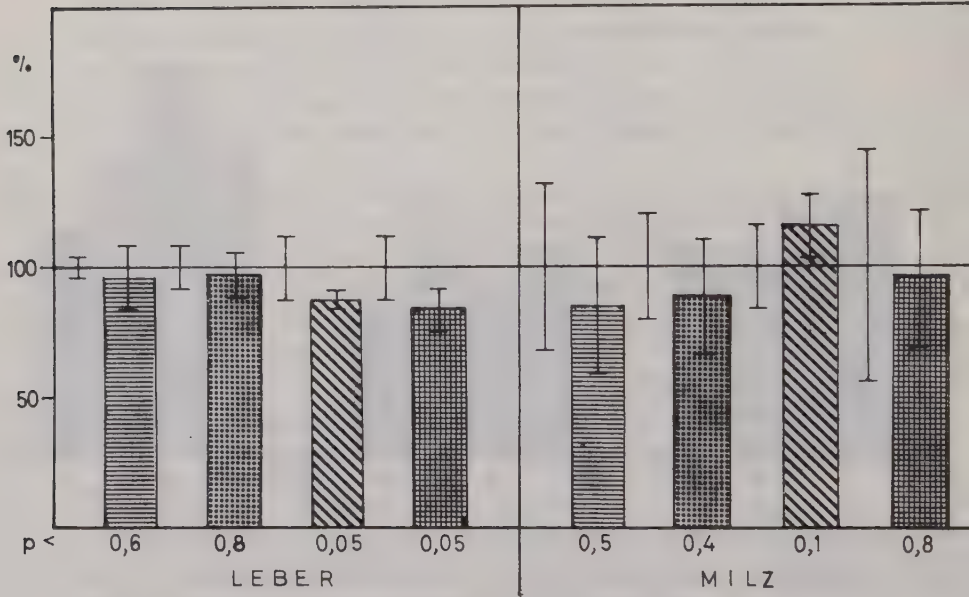


Abb. 37: DNase II-Aktivität, rel. Organgewicht und Proteingehalt in Leber und Milz 3 Tage nach 3maliger Gabe von 0,50 mg Poly(rI)·Poly(rC)/kg K. gew.

Kennzeichnung der Säulen:

-  rel. Organgewicht
-  Proteingehalt
-  DNase II-Aktivität
-  DNase II-Aktivität · f

Ordinate: Prozentuale Veränderungen unter dem Einfluß von Poly(rI)·Poly(rC) (Kontrollen = 100 %). Alleinstehende Balken auf der Kontrolllinie zeigen die Standardabweichung der Kontrollen.

n = 5 Tiere je Gruppe

4.3.2.3.3. Anilinhydroxylase-Aktivität

Poly(rI)·Poly(rC) führte im m. Ü. der Leber zu einem nicht signifikanten, 10 %igen Abfall der spezifischen Aktivität der Anilinhydroxylase von 0,174 auf 0,156 nmol p-Ap/min·mg Protein, bzw. nach Korrektur der 6 %igen Zunahme des rel. Organgewichts zu einer nur 6 %igen Abnahme der spezifischen Aktivität (Abb. 38).

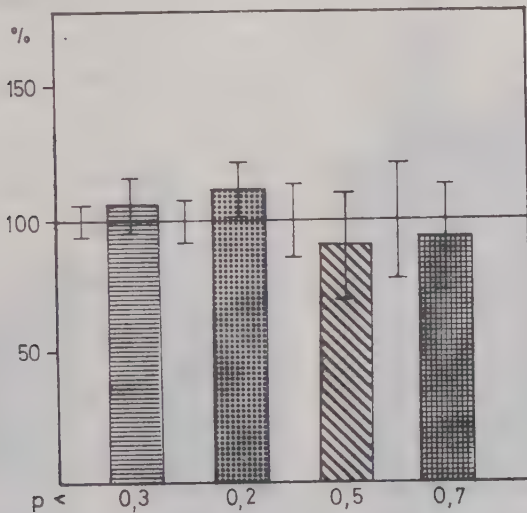
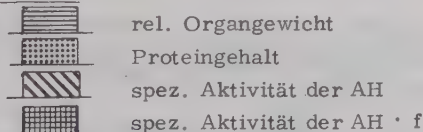


Abb. 38: Anilinhydroxylase-Aktivität, rel. Organgewicht und Proteingehalt der Leber 72 h nach 3maliger Gabe von 0,50 mg Poly(rI)·Poly(rC)/kg K.gew.

Kennzeichnung der Säulen:



Ordinate: Prozentuale Veränderungen unter dem Einfluß von Poly(rI)·Poly(rC) (Kontrollen = 100 %). Alleinstehende Balken auf der Kontrolllinie zeigen die Standardabweichung der Kontrollen.

n = 5 Tiere je Gruppe

4.3.2.3.4. Einbau von Phenylalanin-U-¹⁴C

24 h nach der letzten von 3 Poly(rI)·Poly(rC)-Injektionen kam es durch Anstieg der Proteinkonzentration um 19,5 % und Verringerung der Impulsrate um 26 % zu einem 38 %igen Abfall der spezifischen Aktivität von 59,6 auf 36,9 Imp./min · mg Protein des m. Ü. (Abb. 39).

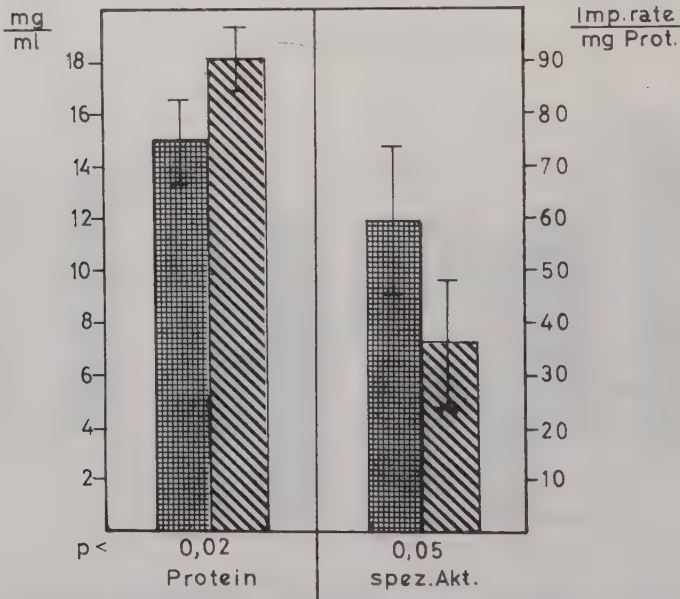


Abb. 39: Phenylalanin-U-¹⁴C-Aktivität und Proteinkonzentration im m. Ü. der Leber 24 h nach 3maliger Gabe von 0,50 mg Poly(rI)·Poly(rC)/kg K. gew.

Kennzeichnung der Säulen:



Kontrollen

Poly(rI)·Poly(rC)-behandelte Tiere

Ordinaten: Proteinkonzentration in mg/ml m. Ü.
spezifische Aktivität als Imp. rate/mg Prot. des m. Ü.
n = 5 Tiere je Gruppe

4.3.2.3.5. Thymidin-2-¹⁴C-Einbau

Unter der Wirkung von Poly(rI)·Poly(rC) zeigten sich wie bei den anderen untersuchten Polyanionen erst 72 h nach der letzten Injektion deutliche Veränderungen der ¹⁴C-Aktivität der DNA. Nach 24 h wiesen weder die DNA-Konzentration noch die Impulsrate gegenüber dem Durchschnittswert der Kontrollen wesentliche Unterschiede auf, während nach 72 h beide Parameter um 16,6 % bzw. 30,6 % verringert waren. Dieser unproportionale Abfall bedingte eine Abnahme der spezifischen Aktivität der DNA um 25,3 % (Abb. 40).

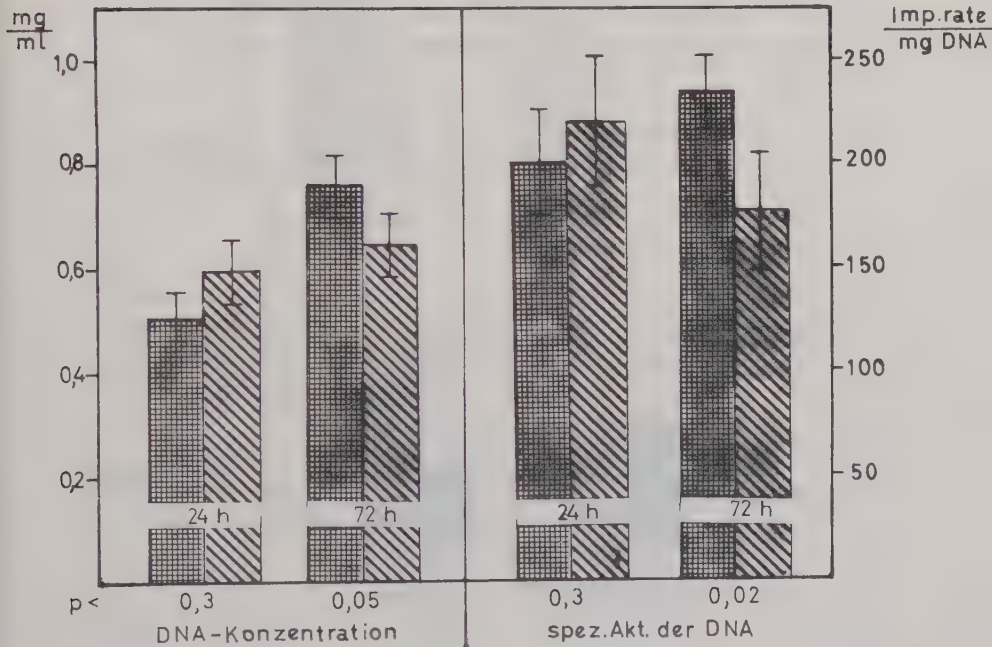


Abb. 40: Thymidin-2-¹⁴C-Einbau und DNA-Konzentration in der Leber 24 und 72 h nach 3maliger Gabe von 0,50 mg Poly(rI)·Poly(rC)/kg K. gew.

Kennzeichnung der Säulen:



Kontrollen



Poly(rI)·Poly(rC)-behandelte Tiere

Ordinaten: DNA-Konzentration in mg/ml Homogenat
spez. Aktivität der DNA als Imp. rate/mg DNA

n = 5 Tiere je Gruppe

4.3.2.3.6. Thymidin-2-¹⁴C-Einbau in die DNA von Hepatozyten und Zentrifugationsüberständen

In den Hepatozyten war 72 h nach der letzten Injektion von Poly(rI)·Poly(rC) bei unverändertem DNA-Gehalt die spezifische Aktivität der DNA um über 170 % erhöht, wobei diese Zunahme jedoch vollständig im Bereich der hohen Standardabweichungen lag (Abb. 41).

Demgegenüber waren in den vereinigten 50 + 20 x g-Überständen bei nicht signifikanter Zunahme des DNA-Gehalts um 40,8 % die Impulsrate um 13 % und die spezifische Aktivität um 46,4 % erniedrigt (Abb. 42).

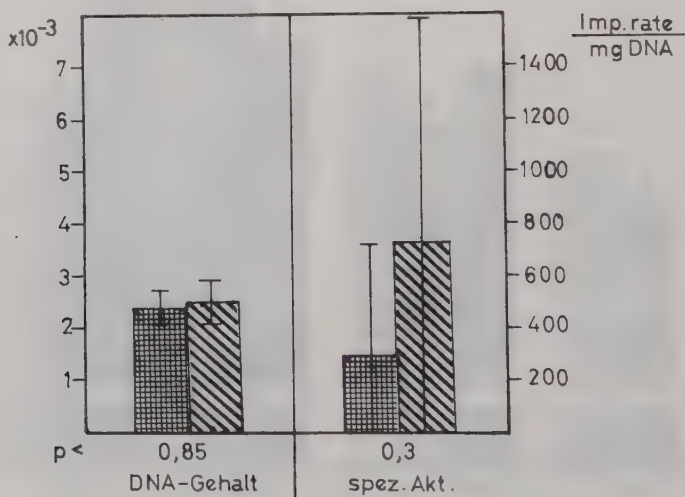


Abb. 41: Thymidin-2-¹⁴C-Einbau und DNA-Gehalt in Hepatozyten 72 h nach 3maliger Injektion von 0,50 mg Poly(rI)·Poly(rC)/kg K. gew.

Kennzeichnung der Säulen:



Kontrollen



Poly(rI)·Poly(rC)-behandelte Tiere

Ordinaten: DNA-Gehalt als Anteil der DNA am Trockengew. · 10⁻³
spez. Aktivität der DNA als Imp. rate/mg DNA

n = 7 Tiere je Gruppe

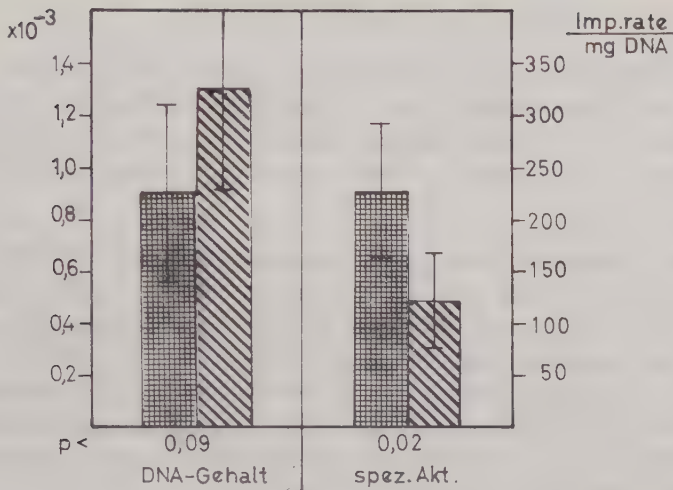


Abb. 42: Thymidin-2-¹⁴C-Einbau und DNA-Gehalt in den gepoolten 50 + 20 x g-Überständen 72 h nach 3maliger Gabe von 0,50 mg Poly(rI)·Poly(rC)/kg K.gew.

Kennzeichnung der Säulen:



Kontrollen



Poly(rI)·Poly(rC)-behandelte Tiere

Ordinaten: DNA-Gehalt als Anteil der DNA am Trockengew. · 10⁻³
spez. Aktivität der DNA als Imp. rate/mg DNA

n = 7 Tiere je Gruppe

4.3.2.4. Ergebnisse an den Reaktionsmaxima

In Tab. 20 sind für alle 3 untersuchten Polyanionen die gesamten Ergebnisse zusammengefaßt, die 72 h (bzw. bei Markierung mit Phenylalanin-U- ^{14}C 24 h) nach 3maliger Applikation von 25 mg PVS, 100 mg DNA bzw. 0,50 mg Poly(rI)·Poly(rC)/kg K.gew. erhalten worden waren.

Diesen Ergebnissen zufolge waren unter dem Einfluß von P V S in der L e b e r alle Werte deutlich über den Kontrolldurchschnitt erhöht. Eine Ausnahme machte die Anilinhydroxylase-Aktivität; sie war zum fraglichen Zeitpunkt signifikant gehemmt. Die in der M i l z untersuchten Werte wiesen ebenfalls ausnahmslos deutliche Zunahmen auf, während im T h y m u s bei Organverkleinerung mit Abfall des rel. Organgewichts und des Proteingehalts nur der Nukleinsäuregehalt angestiegen war (Tab. 20).

Auch nach DNA-Verabreichung waren in der Leber Proteingehalt, DNA-Gehalt und Einbaurrate von ^{14}C -markierten Vorstufen (außer in den Hepatozyten) erhöht und die Anilinhydroxylase-Aktivität gehemmt. Die anderen untersuchten Parameter unterschieden sich, abgesehen vom deutlich erniedrigten RNA-Gehalt, nicht eindeutig vom Kontrolldurchschnitt. In Milz und Thymus war die Organvergrößerung von unterschiedlich starken, durchwegs signifikanten Zunahmen der untersuchten Organbestandteile begleitet. Auch die DNase II zeigte in der Milz Aktivitätszuwachs (Tab. 20).

Abgesehen von einer Zunahme des Proteingehalts im Thymus lagen nach Poly(rI)·Poly(rC) - Applikation alle signifikant veränderten Werte in den 3 untersuchten Organen u n t e r den Werten der Kontrolldurchschnitte. Dabei war, außer in den Hepatozyten, der Einbau von ^{14}C -markierten Vorstufen am stärksten gehemmt (Tab. 20).

	P V S	D N A	Poly(rI) · Poly(rC)
<u>Le b e r</u>			
rel. Org. gew.	+	0	0
RNA	+++	-	-
Protein	+	0	0
¹⁴ C-Akt. im Prot. (24 h p. ii.)	++	++	--
DNA	+++	++	0
¹⁴ C-Akt. der DNA v. Gesamtleber	++	++	--
Hepatozyten	++++	0	0
Zentrif. ü. stände	++++	++++	---
DNase II	+++	0	-
AH	---	--	0
<u>M i l z</u>			
rel. Org. gew.	++	++	0
Protein	+++	++	-
RNA	+++	n.b.	---
DNA	++++	+++	0
DNase II	+++	+++	0
<u>T h y m u s</u>			
rel. Org. gew.	--	++	0
Protein	--	++++	+++
RNA	++	++++	0
DNA	+++	++++	0

Tab. 20: Ergebnisse 72 h nach 3maliger Gabe von 25 mg PVS, 100 mg DNA bzw. 0,50 mg Poly(rI)·Poly(rC)/kg K.gew. in Leber, Milz und Thymus zusammenfassend.

Prozentuale Veränderungen bezogen auf den Kontrolldurchschnitt
(= 100 %).

Erklärung der Symbole:
signifikante Zunahmen:

0 = nicht signifikante Veränderung
+ = unter 25 %, ++ = 25 - 50 %, +++ = 50 - 100 %, ++++ = über 100 %

signifikante Abnahmen:

- = unter 20 %, -- = 20 - 40 %, --- = über 40 %

5. DISKUSSION

Der gemeinsame Angriffspunkt verschieden strukturierter polyanionischer Makromoleküle ist in Elementen des retikuloendothelialen Systems zu sehen, die sowohl bei der Aufnahme und Speicherung von Polyanionen, als auch bei der Weitergabe von Nukleinsäuren eine bedeutende Rolle spielen (80, 125, 166, 171, 175). Die dabei von den meisten Polyanionen bewirkte Stimulation des RES (145) äußert sich unter anderem in Aktivitätssteigerungen verschiedener saurer Hydrolasen infolge Permeabilitätsänderungen an der Lysosomenmembran (170, 171, 173, 186) sowie in starker retikulärer Proliferation (171, 173, 186). Die proliferativen Veränderungen sind die Folgen einer v. a. unter verstärkter DNA-Synthese ablaufenden Aktivierung hämopoetischer Stammzellen in Form einer Vermehrung von Antikörper-bildenden Zellen und Erinnerungszellen (B- und T-Lymphozyten) sowie von kernhaltigen Zellen der Megakaryozytose und Erythropoese in der Milz und anderen lymphatischen Organen, gefolgt von einer überwiegend lymphozytären Leukozytose (11, 47, 51, 152). Der Umfang dieser Veränderungen ist nicht nur mit der Proliferationsrate der einzelnen Organe korreliert (Milz > Lunge > Leber > Niere) (171, 175), sondern auch, wie die dargelegten Befunde und z. T. frühere Untersuchungen (171) zeigen, von der Art des Polyanions, der Dosis und dem Versuchszeitpunkt abhängig. Während in der Milz im allgemeinen proliferative Reaktionen ablaufen (171, 186; Tab. 13, 16, 19), zeigen sich in der Leber für die drei untersuchten Polyanionen jeweils unterschiedliche Wirkungsmechanismen, die sich streckenweise gleichartig, z. T. aber auch antagonistisch verhalten:

5.1. P V S

PVS bewirkte übereinstimmend mit früheren Ergebnissen (171, 173, 186) über die ganze Dosisbreite, die sich bis in den Bereich der $DL_{50/30d}$ (zwischen 72 und 78 mg/kg K.gew.) (173) erstreckte, deutliche hyperplastische Reaktionen an Leber und Milz, während sich der

Thymus durchwegs verkleinerte (Tab. 11 - 14, Abb. 22). Die im oberen Dosisbereich nachweisbaren Veränderungen können überwiegend als histiolytische und reparative Vorgänge gedeutet werden. Sie sind die Folge der durch Permeabilitätsdefekte gekennzeichneten zytotoxischen Wirkung von PVS und laufen im allgemeinen früher ab als Zellkern-spezifische Reaktionen (170, 173, 186). Im unteren Dosisbereich hingegen dürften proliferative Reaktionen gegenüber Permeabilitätsdefekten im Vordergrund stehen, in deren Verlauf es unter Aktivierung der hämopoetischen Stammzellen zu einer starken Lymphozytenmobilisation kommt (PVS gehört zur Gruppe der "lymphocyte mobilizing compounds") (11, 152). Infolge der dadurch bedingten lymphozytären Leukozytose kommt es zu einer Lymphozytenverschiebung v. a. aus dem Thymus (Absinken der Thymozytenzahl) in die Milz (Anreicherung von Lymphozyten) (11, 46, 152). So kann die Thymusinvolution als Folge von Thymozytenausschwemmung betrachtet werden, wodurch allerdings eine gleichzeitig ablaufende, am gesteigerten Nukleinsäuregehalt erkenntliche retikuläre Proliferation überdeckt wird.

Bei den Zunahmen von Protein-, DNA- und RNA-Gehalt in der Milz ist demgegenüber der Einfluß der Lymphozytenimmigration zu berücksichtigen. Jedoch deutet die starke Zunahme der DNase II-Aktivität des Organs nach Ablauf von 3 Tagen p. i. umfangreiche proliferative Reaktionen an. Zusätzlich kann angenommen werden, daß zytotoxisch bedingte Erhöhungen der DNase II-Aktivität (infolge Lysosomenzusammenbruchs) (173) bei der gewählten Dosierung im Hintergrund stehen (Abb. 23). Der in anderen Untersuchungen festgestellte, der Aktivierung des Enzyms in den ersten 48 h nach der Injektion vorausgehende Aktivitätsabfall ist verhältnismäßig spezifisch und beruht - im Unterschied zu dem in vitro gegebenen Hemmechanismus - möglicherweise auf einer irreversiblen Schädigung des Enzymproteins (173, 186).

Histologisch zeigen sich in der Leber nach Verabreichung von PVS deutliche Reaktionen der RES-Anteile in Form von Schwellung der Kupffer'schen Sternzellen mit Speicherung von fein- bis mittelkörnigem Material und retikulärer Proliferation (80, 186). Auch biochemisch kommt die selektive Stimulation von RES-Bestandteilen der

Leber in einer Steigerung der Aktivität der DNase II (Leitenzym für RES-Anteile) zum Ausdruck (171, 173, 186; Abb. 23).

Demgegenüber wird durch PVS die Aktivität und Induzierbarkeit der mikrosomalen Anilinhydroxylase der Leber gehemmt, weshalb Induktionsphänomene allgemeiner Art in den Parenchymzellen ausgeschlossen werden können (81; Abb. 24). Die Hemmung des Enzyms könnte über die Beeinflussung von Translationsvorgängen (evtl. durch Polysomendissoziation) erklärt werden (81, 180, 181), wofür auch die Feststellung aus früheren und den vorgelegten Untersuchungen spricht, daß die Veränderungen des Proteingehalts deutlich hinter dem Zuwachs des DNA-Gehalts zurückblieben (171; Tab. 11, Abb. 22).

Wird die Leber durch Phenobarbital induziert, hemmt PVS den Einbau markierter Vorstufen in mikrosomales Protein (81). Im Gegensatz dazu zeigte sich vorliegend eine rasch eintretende Erhöhung der Proteinsyntheserate, die jedoch nur von kurzer Dauer war (Abb. 25, Tab. 11). Der Vergleich dieses Befundes mit dem gleichzeitig gegensätzlichen Verhalten der DNA-Syntheserate (Zunahmen erst im weiteren Versuchsverlauf) (Abb. 26) verweist auf Analogien mit der nach Teilhepatektomie regenerierenden Leber, in der kurzfristige Stimulation des Proteinstoffwechsels vor oder zumindest gleichzeitig mit intensiver DNA-Synthese während der Proliferationsphase (2- bis 50fache Steigerung des Einbaus von radioaktiv markiertem Thymidin) abläuft und als biochemische Aktivierung der für die Zellteilung erforderlichen Systeme anzusehen ist (13, 87, 174).

Angesichts des unter dem Einfluß von PVS deutlich erhöhten Einbaus von markierten Vorstufen in die DNA von RES-Bestandteilen (Abb. 28) der Leber kann die bereits durch Erhöhung der DNase II-Aktivität nahegelegte retikuläre Proliferation als erwiesen gelten. Insgesamt wies die DNA-Syntheserate der Leber umfangreichere Zunahmen als die DNase II-Aktivität auf. Dieser Befund scheint die schon früher geäußerte Vermutung zu bestätigen, daß die retikuläre Reaktion in der Leber nicht an eine zytotoxische Wirkung von PVS an Anteile des retikuloendothelialen Systems der Leber gebunden ist.

Im pathologisch-anatomischen Erscheinungsbild von PVS-Vergiftungen zeichnet sich allerdings eine starke toxische Wirkung auf Leberparenchymzellen ab, die in Form von deutlicher Läppchenzeichnung bis hin zu disseminierten Nekrobiosen mit entsprechenden bindegewebigen Reaktionen zum Ausdruck kommt (150, 173). Biochemisch zeigt sich vorliegend eine derartige Leberschädigung durch die starke Hemmung der Anilinhydroxylase-Aktivität (Abb. 24). Dementsprechend kann der umfangreiche Anstieg der DNA-Synthese in Hepatozyten (Abb. 27) bei der gewählten Dosierung als Folge einer durch die Schädigung der Leberzellen induzierten Regeneration aufgefaßt werden. Die hohen Standardabweichungen dieser Veränderungen zeigen, daß die regenerativen Prozesse zum Untersuchungszeitpunkt bei einzelnen Versuchstieren noch nicht oder in sehr unterschiedlichem Umfang eingesetzt hatten.

Insgesamt gesehen bewirkt PVS in der Leber eine selektive Stimulation von RES-Bestandteilen mit starker retikulärer Proliferation und eine toxische Schädigung von Hepatozyten, die umfangreiche regenerative Prozesse auslöst.

5.2. D N A

Die bevorzugte Aufnahme exogener DNA in Gewebe mit hoher Proliferationsrate, zu denen auch die Elemente des retikuloendothelialen Systems zu rechnen sind, führt im allgemeinen zu deutlichen hyperplastischen Veränderungen der betroffenen Gewebe, wie z. B. in Milz, Thymus und Leber (95, 123, 171, 175; Tab. 14 - 16). Darüberhinaus muß jedoch bei der Stimulation der retikulären Proliferation auch die in vivo beobachtete antigene Wirkung exogener DNA berücksichtigt werden (19a). Die hyperplastischen Reaktionen sind, wie sich in früheren und in den vorliegenden Untersuchungen besonders einheitlich am Thymus bei der höchsten DNA-Dosierung zeigen ließ, die Folge einer Steigerung der gesamten Makromolekülsynthese einschließlich der Proteinsynthese (43; Tab. 16). Sie unterscheiden sich damit deutlich vom Wirkungsbild sulfatierter, nukleotidfreier

Polyanionen. Exogene DNA scheint (anders als PVS) keine hemmenden Einflüsse auf Translationsvorgänge bzw. den Transport von Aminosäuren zu den Synthesorten auszuüben. Die Zunahmen im DNA-Gehalt dürften einmal durch verstärkte De novo-Synthese infolge erhöhten Angebots an Vorstufen zum anderen durch den Proliferationsreiz deponierter, höhermolekularer Anteile exogener DNA bedingt sein. Bei den Veränderungen des RNA-Gehalts muß neben gesteigerter (vom Umfang der Derepression der DNA abhängiger) Syntheserate zelleigener RNA auch an die Möglichkeit von Transkriptionsvorgängen an Nukleotidsequenzen der exogenen DNA gedacht werden (43, 71).

Das zur PVS-Wirkung gegensätzliche, deutlich hyperplastische Verhalten der Thymusdrüse findet in der unter der Einwirkung exogener DNA fehlenden Lymphozytenmobilisation (die ausschließlich auf stark dissoziierende, nukleotidfreie Polyanionen beschränkt ist: 11, 152) in Verbindung mit retikulärer Proliferation seine Begründung. Wie sich aus dem ungleichen Verhältnis der Zunahmen von Gewicht und Gehalten von Protein, DNA und RNA schließen läßt, war die Vergrößerung des Thymus zum Untersuchungszeitpunkt noch nicht abgeschlossen (Tab. 16).

Insgesamt gesehen können auch die Veränderungen in der Milz (Anstieg von Protein-, DNA-Gehalt und DNase II-Aktivität) (Tab. 15, Abb. 29 und 30) als proliferative Reaktionen aufgefaßt werden; dies gilt umso mehr als aufgrund fehlender Lymphozytenmobilisation keine passiven Erhöhungen von Organgewicht und -gehalten durch Lymphozytenimmigration in Betracht gezogen werden müssen. Die Zunahmen der DNase II-Aktivität sind der biochemische Ausdruck gesteigerter DNA-Synthese und erhöhten intrazellulären Abbaus exogener DNA-Anteile an DNase II. Geringen Einfluß dürfte die gelegentlich für sehr hohe Konzentrationen diskutierte zytotoxische Wirkung der DNA besitzen, zumal sie nicht (wie im Falle von PVS) über Permeabilitätsdefekte, sondern wahrscheinlich durch Persistenz und Kumulation neugeformter Makromoleküle (v. a. RNA) zum Zelluntergang führt (43).

Die an der Leber erhobenen Befunde zeigen, daß die Steigerung von DNA-Gehalt und DNA-Syntheserate (Tab. 14, Abb. 29 und 33) ausschließlich auf eine Erhöhung der DNA-Synthese (um mehr als das Doppelte) in Elementen des RES zurückzuführen ist (Abb. 35), während DNA-Gehalt und Einbau markierter Vorstufen in den Hepatozyten durch exogene DNA nicht verändert wurden (Abb. 34). Diese, der PVS-Wirkung entsprechende selektive Stimulation von RES-Bestandteilen der Leber war mit Hilfe der DNase II vorliegend nicht, wohl aber in früheren Versuchen bei längerer DNA-Applikation (171) belegbar. Ähnlich wie PVS verminderte DNA in hohen Dosen trotz eines deutlichen Anstiegs der Proteinsyntheserate Anilinhydroxylase-Aktivität und RNA-Anteil des Organs. Der Proteingehalt blieb dabei konstant oder erhöhte sich nur unwesentlich (Abb. 32, Tab. 14). Daraus folgt, daß exogene DNA unter geeigneten Bedingungen auch in vivo in Translations- und Transkriptionsvorgänge (evtl. durch Überlagerung mit der RNA-Polymerase) der Parenchymzellen eingreifen kann. Unter Berücksichtigung der Zunahmen von Protein- und RNA-Gehalt in Thymus und Milz sowie der Steigerung der Proteinsyntheserate in der Leber liegt die Vermutung nahe, daß auch in RES-Bestandteilen der Leber unter der Wirkung exogener DNA eine Steigerung der gesamten Makromolekülsynthese abläuft. Sie tritt jedoch gegenüber den hemmenden Einflüssen auf RNA- und Proteinsynthese in Hepatozyten in den Hintergrund.

Auch exogene DNA bewirkt somit in der Leber eine selektive Stimulation von RES-Bestandteilen, während sie Hepatozyten (im Gegensatz zu PVS) nicht toxisch schädigt, dort jedoch neben Translations- auch Transkriptionsvorgänge beeinflusst.

5.3. Poly(rI)·Poly(rC)

Die antimitotische Wirkung von Poly(rI)·Poly(rC) im nicht-toxischen Bereich (bei Dosen unter 3 mg/kg K.gew.: 127) beruht auf einer Hemmung der gesamten Makromolekülsynthese (25, 31, 103, 111, 112, 116, 127). So hemmt z. B. Poly(rI)·Poly(rC) die Isopro-

terenol-stimulierte DNA-Synthese in Mäusespeicheldrüsen (25) und die damit verbundene Proliferation, die Zellvermehrung normaler und maligner Zellen, die Regeneration der Leber nach Teilhepatektomie und das Wachstum von Organen junger Ratten (103, 111). Infolge seiner Wirkung auf mitotisch aktive Zellen führt Poly(rI)·Poly(rC) zu einer rund 60- bis 80 %igen Abnahme hämopoetischer Stammzellen, gefolgt von einem peripheren Abfall von Leukozyten und Retikulozyten. Die Steigerung der Immunantwort wird dadurch allerdings nicht beeinflusst (93). Bei der Hemmung des Tumorstwachstums durch Poly(rI)·Poly(rC) scheint die Stimulation des Immunsystems nicht der wesentliche Faktor zu sein, da die Wirkung des Polyanions auf die Proliferation maligner Zellen auch bei Immunsuppression abläuft (103) und in Tumorgeweben keine Lymphozytenimmigration beobachtet werden kann (142). Wesentliche Ursache der carcinostatistischen Wirkung von Poly(rI)·Poly(rC) ist somit die Beeinflussung der Makromolekülsynthese, zumal sich die Wirkung nicht nur auf virusinduzierte Tumoren (bei denen v. a. eine Wirkung über Interferoninduktion in Betracht zu ziehen ist: 93, 112), sondern auch auf chemisch- und strahlen-induzierte, transplantierte und Spontantumoren erstreckt (56). Entsprechend diesen Befunden ist auch eine Hemmung der retikulären Proliferation in Organen zu erwarten, die RES-Elemente enthalten:

Obwohl der gewählte Dosisbereich im Thymus eine einheitliche Reaktion vermissen läßt, äußerten sich signifikante Veränderungen - von wenigen Ausnahmen abgesehen - in einer Verringerung von DNA-, RNA- und Proteingehalt (Tab. 19). Übereinstimmend damit verweisen andere Befunde auf ausgeprägte Thymushypoplasie mit Rindennekrosen und Lymphozytenausschwemmung unter den Bedingungen chronischer Poly(rI)·Poly(rC)-Applikation (31, 38, 83).

Dosisabhängig, jedoch nicht dosisproportional, entsteht unter dem Einfluß von Poly(rI)·Poly(rC) das Erscheinungsbild des "runt-syndrom"; es ist durch starke Milzvergrößerung bei gleichzeitiger Thymusinvolution gekennzeichnet (31). Derartige Veränderungen zeigten sich vorliegend nach einmaliger Injektion der höchsten Do-

sis zum früheren Versuchszeitpunkt in Form mehrfacher Erhöhung aller untersuchten Parameter in der Milz bzw. (nicht durchwegs signifikanter) Abnahme der gleichen Parameter im Thymus (Tab. 18 und 19). Als Ursachen scheiden Lymphozytenmobilisation und Proliferation hämopoetischer Stammzellen aus (beispielsweise ist der Einbau von ^{14}C -Thymidin in Lymphozyten nach Stimulation durch Phytohämagglutinin unter der Wirkung von Poly(rI)·Poly(rC) unterdrückt). Vielmehr wird eine Veränderung der Lymphozytenrezirkulation in Betracht gezogen, wodurch die Lymphozyten in der Milz zurückgehalten werden (31). Im Gegensatz dazu entwickelt sich nach chronischer Verabreichung eine deutliche Milzhypoplasie, deren Umfang jedoch mit steigender Dosis abnimmt (Tab. 18, Abb. 36). Derartige Milzverkleinerungen waren auch im Verlauf chronischer Poly(rI)·Poly(rC)-Vergiftungen feststellbar, deren Ursache in einer Verlangsamung der retikulären Proliferation gesehen wurde (31, 38, 83).

In der Leber zeigten sich über den ganzen Dosisbereich Abnahmen von Protein-, DNA- und RNA-Gehalt; gegensätzlich verhielt sich lediglich der RNA-Gehalt nach einmaliger Injektion zum späteren Versuchszeitpunkt (Tab. 17). Wird die sich hier andeutende Erhöhung der RNA-Synthese als Folge einer durch Poly(rI)·Poly(rC) bedingten Steigerung der Interferoninduktion und der Antikörpersynthese (91, 110) angesehen, könnte der Abfall des RNA-Gehalts nach dreimaliger Verabreichung unter dem Aspekt einer (schon in anderen Untersuchungen festgestellten und sich nach chronischen Poly(rI)·Poly(rC)-Gaben entwickelnden) hyporeaktiven Phase der Interferoninduktion gesehen werden (27; Tab. 17).

Die Beeinflussung der Makromolekülsynthese in der Leber ist aus der Verringerung von Protein- und DNA-Syntheserate ersichtlich (Abb. 39 und 40). Wie sich schon aus dem (auch früher festgestellten) Abfall der DNase II-Aktivität schließen ließ (17; Abb. 37), war die DNA-Synthese in den RES-Bestandteilen der Leber gegenüber den Parenchymzellen selektiv gehemmt (Abb. 41 und 42). Diese Unterdrückung der retikulären Proliferation stimmt mit Befunden an der Milz, in der ebenfalls der Einbau radioaktiv markierter Vorstufen

gehemmt wird (31), und der schon anderweitig festgestellten Tatsache überein, daß Poly(rI)·Poly(rC) in nicht-toxischen Dosen die Phagozytose-Aktivität des RES unterbindet (127).

Hemmung der Proteinsynthese wurde auch an Leberexplantaten nachgewiesen (116); sie ist wahrscheinlich die Folge einer Beeinflussung von Translationsvorgängen und Transport (Aminosäuren)-Phänomenen (11, 112) sowohl in Zellen des RES als auch in Parenchymzellen. Obwohl Poly(rI)·Poly(rC) in der gewählten Dosierung keine Wirkung auf die Anilinhydroxylase ausübte (Abb. 38), trat in anderen Untersuchungen mit höheren Dosen eine Hemmung der gemischt-funktionellen Oxidasen in vitro und in vivo mit einer Verlängerung der Schlafzeit nach Phenobarbital um 167 % ein (127).

Im Gegensatz zu den anderen untersuchten Polyanionen zeigten sich somit nach Poly(rI)·Poly(rC) in der Leber eine auf die RES-Elemente beschränkte Hemmung der gesamten Makromolekülsynthese und eine daraus resultierende Unterdrückung der retikulären Proliferation. In den Parenchymzellen trat eine der Wirkung der anderen Polyanionen entsprechende Beeinflussung von Induktionsvorgängen ein.

Weitere Untersuchungen zur Wirkung von Polyanionen sollten v. a. Aufschlüsse bringen über

1. im einzelnen bei der retikulären Proliferation und Stimulation des Immunsystems ablaufende Prozesse, sowohl auf zellulärer Basis wie auch auf der Ebene der Replikation, Transkription und Translation,
2. Verhalten der Permeabilität zellulärer und subzellulärer Membranen mit genauerer Abgrenzung zytotoxischer Wirkungen,
3. Lokalisation der jeweils betroffenen DNase II-Fraktion,
4. Wahrscheinlichkeit und Bedeutung der einzelnen möglichen Mechanismen, die für die Tumorchemmung verantwortlich gemacht werden.

6. ZUSAMMENFASSUNG

Nach umfangreichen methodischen Untersuchungen zur Standardisierung der Versuchsbedingungen wurden an ca. 750 weiblichen Mäusen die Wirkungen von Polyvinylsulfat (PVS, 12,5 - 75 mg/kg K.gew.), heterologer, hochmolekularer Desoxyribonukleinsäure (DNA, 25 - 100 mg/kg K.gew.) und Poly(rI)·Poly(rC) (0,25 - 1,0 mg/kg K.gew.) auf Gewicht, Protein-, DNA- und RNA-Gehalt von Leber, Milz und Thymus, Desoxyribonuklease II (DNase II, EC 3.1.4.6.)-Aktivität von Leber und Milz, Anilinhydroxylase-Aktivität und Proteinsynthese (Einbau von Phenylalanin-U-¹⁴C in mikrosomales Protein) der Leber sowie der Einbau von Thymidin-2-¹⁴C in die DNA von Gesamtleber, Hepatozyten und Bestandteilen des RES untersucht. Die dabei durch die einzelnen Polyanionen bewirkten Veränderungen lassen sich zusammenfassen wie folgt:

1. Durch 3malige Gabe von 25 mg/kg PVS wurden der Nukleinsäuregehalt in allen untersuchten Organen sowie die Aktivität der DNase II von Leber und Milz, die Markierung von Mikrosomenprotein der Leber durch Phenylalanin-U-¹⁴C und der Einbau von Thymidin-2-¹⁴C in die DNA von Gesamtleber, Hepatozyten und Bestandteilen des RES erhöht. Die Aktivität der Anilinhydroxylase der Leber sowie Gewicht und Proteingehalt des Thymus nahmen ab.
2. Nach 3maliger i.v. Injektion von 100 mg/kg DNA lagen DNA-Gehalt, Einbau von Phenylalanin-U-¹⁴C in die Mikrosomenfraktion sowie Einbau von Thymidin-2-¹⁴C in die DNA von Homogenaten und Bestandteilen des RES der Leber über, die Anilinhydroxylase-Aktivität des Organs unter dem Vergleichsdurchschnitt. Unter den gleichen Bedingungen hatten sich Gewicht, Protein- und Nukleinsäuregehalt des Thymus und DNase II-Aktivität, DNA- und Proteingehalt der Milz erhöht.
3. Poly(rI)·Poly(rC) (3malige Verabreichung von 0,50 mg/kg) führte in der Leber zu einer Verringerung von Protein- und RNA-Gehalt, DNase II-Aktivität sowie Phenylalanin-U-¹⁴C-Einbau in mikroso-

males Protein und Markierung der DNA von Homogenaten und Bestandteilen des RES durch Thymidin-2-¹⁴C. Protein- und RNA-Gehalt der Milz nahmen ab, während der Proteingehalt des Thymus eine deutliche Zunahme erkennen ließ.

Schlußfolgerungen:

Infolge Lymphozytenmobilisation und Steigerung der retikulären Proliferation bewirkt P V S in der Milz hyper- und im Thymus hypoplastische Veränderungen. In der Leber wird die Proliferation von RES-Elementen selektiv stimuliert. Als Reaktion auf die Schädigung der Parenchymzellen kommt es gleichzeitig zu umfangreichen Regenerationsvorgängen.

D N A führt in Leber, Milz und Thymus zu hyperplastischen Veränderungen, die in der Leber nur RES-Anteile betreffen. In den Parenchymzellen können Induktionsvorgänge auf der Ebene der Translation und der Transkription gehemmt werden.

Unter dem Einfluß von Poly(rI) · Poly(rC) reagieren Organe mit RES-Anteilen aufgrund einer Hemmung der gesamten Makromolekülsynthese hypoplastisch. In den Hepatozyten werden gleichzeitig Induktionsvorgänge unterdrückt.

Investigations on the action mechanism of polyanions in vivo

SUMMARY

Following extensive methodical investigations to standardize the conditions of further experiments, studies were carried out on the influence of poly(vinylsulphate) (PVS, 12,5 - 75 mg/kg body-weight), heterologous, high-molecular deoxyribonucleic acid (DNA, 25 - 100 mg/kg), and poly(rI).poly(rC) (0,25 - 1,0 mg/kg) on approximately 750 female mice. Subjects of investigations have been the behaviour of organ-weight, protein-, DNA-, and RNA-content in liver, spleen, and thymus as well as deoxyribonuclease II (DNase II, EC 3.1.4.6.)-activity in liver and spleen, aniline p-hydroxylase-activity and protein-synthesis (incorporation of phenylalanine-U-¹⁴C into microsomal protein) in the liver, and incorporation of thymidine-2-¹⁴C into DNA of total liver, hepatocytes, and components of the RES. The essential results have to be summarized as follows:

1. PVS (3 injections of 25 mg/kg) enhanced the content of nucleic acids in all investigated organs and the activity of DNase II in liver and spleen as well as the incorporation of phenylalanine-U-¹⁴C into the microsomal protein of liver and of thymidine-2-¹⁴C into the DNA of whole liver, hepatocytes, and components of the RES. Simultaneously aniline p-hydroxylase - activity of liver as well as organ-weight and protein-content of thymus were decreased.
2. In the liver 3 injections of 100 mg DNA/kg elevated DNA-content, incorporation of phenylalanine-U-¹⁴C into a microsomal fraction as well as the incorporation of thymidine-2-¹⁴C into DNA of homogenates and RES-components. Aniline p-hydroxylase-activity has been reduced. Under the same conditions, an increasing effect on organ-weight, protein-, and nucleic acid-content of thymus and on DNase II-activity and protein-content of spleen could be demonstrated.
3. In the liver poly(rI).poly(rC) (3 injections of 0,50 mg/kg) caused a decrease of protein- and RNA-content, DNase II-activity, and

incorporation of both, phenylalanine-U- ^{14}C (into microsomal protein) and thymidine-2- ^{14}C (into DNA) of homogenates, as well as RES-components. In the spleen protein- and DNA-content were diminished, too. The protein-content of thymus only showed a significant increase.

Conclusions:

PVS causes in spleen hyperplastic and in thymus hypoplastic changes due to mobilization of lymphocytes and increased reticular proliferation. In the liver proliferation of RES-components is selectively stimulated. Simultaneously damage of parenchymal cells effects extensive regeneration processes.

After injections of DNA, liver, spleen, and thymus show hyperplastic reactions. In the liver they only concern RES-components. In parenchymal cells induction events may be inhibited on the plain of translation and transcription.

Under the influence of poly(rI)·poly(rC), organs with RES-components react in a hypoplastic manner because of inhibition of total macromolecular synthesis. In hepatocytes induction processes are suppressed simultaneously.

7. Literaturverzeichnis

- 1 ABBELS, M.J.F.:
 In vitro action of polyvinylsulfate on acylation and methylation
 of nucleic acids.
 Experientia 26, 483 (1970)

- 2 ADAMSON, R.H., S. FABRO, E.R. HOMAN, R.W. O'GARA,
 and R.P. ZENDZIAN:
 Pharmacology of polyribonucleosinic: polyribocytidylic acid, a
 new antiviral and antitumour agent.
 Antimicrobial Agents and Chemotherapy 148 (1969)

- 3 ALLFREY, V. and A.E. MIRSKY:
 Some aspects of the deoxyribonuclease activities of animal
 tissues.
 J. gen. Physiol. 36, 227 (1952/53)

- 4 ALTMAN, R.L. and D.S. DITTMER:
 Biology data book, p. 398 ff.
 Washington: Fed. Am. Soc. exp. Biol. 1964

- 5 ANGERSTEIN, W.:
 Lexikon der radiologischen Technik in der Medizin, pp. 199, 408
 Leipzig: Thieme 1971

- 6 BACH, D. and I.R. MILLER:
 Interaction of deoxyribonucleic acid with poly-4-vinylpyridine
 Biochim. biophys. Acta 114, 311 (1966)

- 7 BACQ, Z.M.:
 Postirradiation treatments.
 J. Belge Radiol. 55, 557 (1972)

- 8 BADR, G.G. and S. SMEDS:
Influence of pH, DNase, RNase, and heparin on the ultra-
structure of isolated cerebrocortical rat nuclei.
Cytobiologie 8, 421 (1974)

- 9 BANAI, S. and H. TERAYAMA:
Regulation of RNA-synthesis in chromatin (aggregate enzyme)
from rat liver.
Biochim. biophys. Acta 142, 410 (1967)

- 10 BEISENHERZ, G., H.J. BOLTZE, T. BÜCHER, R. CZOK,
K.J. GARBADE, E. MEYER-ARENDT und G. PFLEIDERER:
Diphosphofructose-Aldolase, Phosphoglyceraldehyd-Dehydro-
genase, Milchsäuredehydrogenase, Glycerophosphat-Dehy-
drogenase und Pyruvat-Kinase aus Kaninchenmuskulatur in
einem Arbeitsgang.
Z. Naturforsch. 8b, 555 (1953)

- 11 VAN BEKKUM, D.W. and W.M. ROSS:
Mobilization of normal and malignant cells by polymethacrylic
acid and other polyanions.
p. 195 ff. in: GARRATINI, S. and FRANCHI, G. (eds.):
Chemotherapy of cancer dissemination and metastasis.
New York: Raven 1973

- 12 BENE-CHEMIE:
SP 54 Chemie - Pharmakologie - Klinik.
bene-Chemie-Literaturdienst 12/275/1271

- 13 BENES, L. and E. ROTREKOVA:
Rate of synthesis and stability of DNA in bone marrow cells
incubated with heparin.
Fol. biol. 16, 196 (1970)

- 14 BENES, L. and J. TALLOVA:
Interaction of polyanion polypentosesulphate with bone marrow cells in vitro.
Fol. biol. 20, 419 (1974)

- 15 BERG, T. and D. BOMAN:
Distribution of lysosomal enzymes between parenchymal and Kupffer cells of rat liver.
Biochim. biophys. Acta 321, 585 (1973)

- 16 BERGMAYER, H. U.:
Methoden der enzymatischen Analyse. Band 1, p. 407
Weinheim: Verlag Chemie 1970

- 17 BERNARDI, G.:
Competitive inhibition of acid deoxyribonuclease by poly-ribonucleotides.
Biochem. biophys. Res. Comm. 17, 573 (1964)

- 18 BERNARDI, G.:
Spleen acid deoxyribonuclease.
p. 271 ff. in: BOYER, P. D. (ed.):
The enzymes. Vol. 4.
New York: Academic 1971

- 19 BEYER, H.:
Lehrbuch der organischen Chemie, p. 279
Leipzig: Hirzel 1968

- 19a BHARGAVA, P. M. and G. SHANMUGAM:
Uptake of nonviral nucleic acids by mammalian cells.
Progr. Nucl. Acid Res. mol. Biol. 11, 103 (1971)

- 20 BIELKA, H.:
Molekulare Biologie der Zelle.
Stuttgart: Fischer 1973
- 21 BORNENS, M.:
Action of heparin on nuclei: solubilization of chromatin
enabling the isolation of nuclear membranes.
Nature 244, 28 (1973)
- 22 BRADE, W., A. JARCK, and J. VETTER:
Amino acid incorporating activity and synthesis of free and
membrane bound polysomes in the rat kidney after folic acid.
Biochem. Pharmacol. 21, 1431 (1972)
- 23 BRAUN, M., K. HÄUSLER und F. KRIEGER:
Organische Chemie, p. 161
München: Bayer, Landwirtschaftsverlag 1967
- 24 BRODIE, B. B. and J. J. AXELROD:
The estimation of acetanilid and its metabolic products,
aniline, N-acetyl p-aminophenol and p-aminophenol (free and
conjugated) in biological fluids and tissues.
J. Pharmacol. exp. Ther. 94, 22 (1948)
- 25 BROWN, D. G. and D. S. COFFREY:
Effects of polyinosinic and polycytidylic acid on the deoxy-
ribonucleic acid template activity of isolated nuclei and
soluble chromatin from rat liver.
J. biol. Chem. 247, 7674 (1972)
- 26 BRÜCKNER, V.:
Heparin als Strahlenschutzstoff
Umschau 73 19, 171 (1973)

- 27 BUCKLER, C.E., H.G. DU BUY, M.L. JOHNSON, and S. BARON:
Kinetics of serum interferon response in mice after single and multiple injections of polyI·polyC.
Proc. Soc. exp. Biol. Med. 136, 394 (1971)
- 28 CAMPBELL, P.N. and J.R. SARGENT:
Techniques in protein biosynthesis. Vol. 3, p. 225 ff.
New York: Academic 1973
- 29 CASTLES, T.R., S. CAMPBELL, R. GONGE, and C.C. LEE:
Nucleic acid synthesis in brains from rat tolerant to morphine analgesia.
J. Pharmacol. exp. Ther. 181, 399 (1972)
- 30 CAVALLI - SFORZA, L.:
Biometrie. Grundzüge biologisch-medizinischer Statistik.
Stuttgart: Fischer 1972
- 31 CECAPULCO, H.J., J.W. KREIDER, and M.E. NOGGLE:
Runtsyndrome induced in the rat by polyinosinic-polycytidylic acid.
J. Nat. Cancer Inst. 54, 129 (1975)
- 32 CEJKOVA, M., M. SKALKA, and J. MATYASOVA:
The effect of radiation on deoxyribonucleoproteins in animal tissues.
IV. Changes in the histone component of deoxyribonucleoprotein of irradiated mice and of DNP fractions after interaction with heparin.
Fol. biol. 17, 189 (1971)

- 33 CHAMBON, P., M. RAMUZ, P. MANDEL, and J. DOLY:
Inhibition of RNA polymerase by sodium polyethylene
sulphonate.
Biochim. biophys. Acta 149, 584 (1967)
- 34 CHAMBON, P., M. RAMUZ, P. MANDEL and J. DOLY:
The influence of ionic strength and a polyanion on transcrip-
tion in vitro.
1. Stimulation of the aggregate RNA polymerase from rat
liver nuclei.
Biochim. biophys. Acta 157, 504 (1968)
- 35 CHANDRA, P. und W. APPEL:
Methoden der Molekularbiologie, p. 86 ff.
Stuttgart: Fischer 1973
- 36 CHARLES, P.:
Isolation, preparation and characterization of deoxyribo-
nucleic acids.
p. 10 ff. in: LEDOUX, L. (ed.):
Uptake of informative molecules by living cells.
Amsterdam: North Holland 1972
- 37 CINTI, D. L., P. MOLDENS, and J. B. SCHENKMAN:
Kinetic parameters of drug-metabolizing enzymes in Ca^{2+} -
sedimented microsomes from rat liver.
Biochem. Pharmacol. 21, 3249 (1972)
- 38 DE CLERCQ, E., W. E. STEWART, and P. DE SOMER:
Interferon production linked to toxicity of polyribonucleic
acid - polyribocytidylic acid.
Infect. Immun. 6, 344 (1972)

- 39 COLBY, C.:
The induction of interferon by natural and synthetic polynucleotides.
Progr. Nucl. Acid Res. mol. Biol. 11, 1 (1971)
- 40 COOK, R.T. and M. AIKAWA:
The effects of heparin on endogenous DNA polymerase activity of rat liver nuclei and chromatin fractions.
Exp. Cell Res. 78, 257 (1973)
- 41 CORRIGAN, J.J.:
Effect of anticoagulating and non-anticoagulating concentrations of heparin on the generalized Shwartzman reaction.
Thromb. Diath. haemorrh. 24, 136 (1970)
- 42 CORY, J.G.:
Inhibition of ribonucleotide reductase from Ehrlich tumour cells by RNA.
Cancer Res. 33, 993 (1973)
- 43 CRYSTAL, H.A. and J.L. GLICK:
The influence of partial synchronization of cell growth on the inhibition of L1210 cell viability by mouse thymus DNA.
Experientia 24, 380 (1968)
- 44 DAVIDSON, J.N.:
The biochemistry of the nucleic acids, pp. 223, 227
Glasgow: Science Paperbacks 1972
- 45 DEUTSCH, E.:
Klinische Anwendung der Antikoagulantien.
p. 415 ff. in: EICHLER, O., A. FARAH, H. HERKEN und A.D. WELCH (Hrsg.):
Handbuch der Pharmakologie, Band 27
Berlin: Springer 1971

- 46 DIAMANTSTEIN, T., B. WAGNER, I. BEYSE und M. V. ODENWALD:
Zum Mechanismus der Stimulierung der humoralen Antikörperbildung durch Polyanionen.
Z. klin. Chem. klin. Biochem. 8, 632 (1970)
- 47 DIAMANTSTEIN, T., B. WAGNER, I. BEYSE, M. V. ODENWALD, and G. SCHULZ:
Stimulation of humoral antibody formation by polyanions.
I. The effect of polyacrylic acid on the primary immune response with sheep red blood cells.
Eur. J. Immunol. 1, 335 (1971)
- 48 DIAMANTSTEIN, T., B. WAGNER, I. BEYSE, M. V. ODENWALD, and G. SCHULZ:
Stimulation of humoral antibody formation by polyanions.
II. The influence of sulfate esters of polymers on the immune response in mice.
Eur. J. Immunol. 1, 340 (1971)
- 49 DIAMANTSTEIN, T., B. WAGNER, J. L'AGE-STEHR, I. BEYSE, M. V. ODENWALD, and G. SCHULZ:
Stimulation of humoral antibody formation by polyanions.
III. Restoration of the immune response to sheep red blood cells by polyanions in thymectomized and lethally irradiated mice protected with bone marrow cells.
Eur. J. Immunol. 1, 302 (1971)
- 50 DIAMANTSTEIN, T. and B. WAGNER:
The use of polyanions to break immunological tolerance.
Nature 241, 117 (1973)

- 51 DIAMANTSTEIN, T., D. THEDEN, R. SCHMÜDDERICH,
and J. KIELMANN:
Enhancement of "memory cell" pool by polyanions in mice.
Experientia 29, 707 (1973)
- 52 DIEM, K. und C. LEITNER:
Wissenschaftliche Tabellen, p. 32 ff.
Basel: Documenta Geigy 1968
- 53 DISCHE, Z.:
Über einige neue charakteristische Farbreaktionen der
Thymonukleinsäure und eine Mikromethode zur Bestimmung
derselben in tierischen Organen mit Hilfe dieser Reaktion.
Mikrochemie 8, 4 (1930)
- 54 DOCTOR, V.M.:
Inhibition of human plasma deoxyribonuclease I by
ribonucleic acid.
Proc. Soc. exp. Biol. Med. 138, 241 (1971)
- 55 EBERHARD, A.:
Pattern of dissolution of deoxyribonucleic acid in trichloro-
acetic acid in the presence of protein.
Analyt. Biochem. 46, 660 (1972)
- 56 ELGJO, K. and M. DEGRE:
Polyinosinic-polycytidylic acid in two-stage skin carcino-
genesis. Effect on epidermal growth parameters and inter-
feron induction in treated mice.
J. natl. Cancer Inst. 51, 171 (1973)

- 57 ELGJO, K. and M. DEGRE:
Polyinosinic-polycytidylic acid:
Inhibition of cell proliferation in carcinogen-induced skin
tumours in mice.
J. natl. Cancer Inst. 54, 219 (1975)

- 58 FELLIG, J. and C.E. WILEY:
The inhibition of pancreatic ribonuclease by anionic poly-
mers.
Arch. Biochem. Biophys. 85, 313 (1959)

- 59 FLASCHENTRÄGER, B. und E. LEHNARTZ:
Physiologische Chemie, pp. 1048, 1151
Berlin: Springer (1951)

- 60 FLOSSMANN, K.D. und W. ERLER:
Zum Mechanismus der Farbreaktion von DNA und
2-Desoxyribose mit Orcin.
J. prakt. Chem. 313, 314 (1971)

- 61 FOX, M. and S.R. AYAD:
Uptake and integration of exogenous DNA by lymphoma cells.
p. 295 ff. in: LEDOUX, L. (ed.):
Uptake of informative molecules by living cells.
Amsterdam: North Holland (1972)

- 62 FRANCHI, G., S. GARATTINI, L.K.J. KRAM, and L.M.
VAN PUTTEN:
Effect of polymethacrylic acid (PMAA) on tumour metastasis.
Eur. J. Cancer 2, 383 (1973)

- 63 FRENSTER, J.H.:
Control of DNA strand separations during selective trans-
transcription and asynchronous replication.
5. Experimental repression and de-repression.
In : The cell nucleus-metabolism and radiosensitivity,
p. 36 ff.
London: 1966
- 64 FRIMMER, M.:
Biologische Grundlagen pharmakologischer Wirkungen.
Stuttgart: Schattauer 1971
- 65 FURLONG, N.B.:
Effects of oligonucleotides on the Walker 256 carcinosar-
coma DNA polymerase reaction.
Biochim. biophys. Acta 114, 491 (1966)
- 66 FURLONG, B., F.B. THOMAS, and C.G. MINTZ:
A probable mechanism for apurinic acid inhibition of DNA
synthesis.
FEBS Letters 41, 256 (1974)
- 67 GASTPAR, H.:
Physiologische Bedeutung und pharmakologische Wirkungen
des Heparins.
II. Vorkommen und Stoffwechsel des Heparins, p. 19 ff.
Stuttgart: Schattauer 1965
- 68 GASTPAR, H.:
Physiologische Bedeutung und pharmakologische Wirkungen
des Heparins.
VII. Die Wechselwirkungen mit Enzymen und Hormonen.
Thromb. Diath. haemorrh. 16, 84 (1965)

- 69 GASTPAR, H.:
Physiologische Bedeutung und pharmakologische Wirkungen
des Heparins.
VIII. Die Wirkung des Heparins auf die Wachstumshemmung
von Gewebekulturen und Tumoren.
Thromb. Diath. haemorrh. 16, 90 (1965)
- 70 GINOZA, W. and B.H. ZIMM:
Mechanisms of inactivation of deoxyribonucleic acid by heat.
Proc. nat. Acad. Sci. 47, 639 (1961)
- 71 GLICK, L. and A.P. SALIM:
Inhibition of tumour cell viability by DNA.
Nature 213, 676 (1967)
- 72 GLICK, L.J., A. MAJUNDER, A.C.DUTTON, and
M.E. SCHAEFER:
Transmittance of genetics signals by donor DNA in mamma-
lian cells.
III. Control of the input.
p. 373 ff. in: LEDOUX, L. (ed.):
Uptake of informative molecules by living cells.
Amsterdam: North Holland 1972
- 73 GÖING, H.:
Vielfältige Funktionen einer zweigeteilten Immunabwehr.
Arzneimittelforschung, 24, 819 (1974)
- 74 GOLDENBERG, D.M. and B. HEICKE:
Apurinic acid, a modified DNA with anticancer activity.
Experientia 27, 4449 (1971)

- 75 GOLYSHEW, E.P., P.G. RUBACHEW, and M.S. USPENKAYA:
Influence of exogenous DNA on the activity of DNA-synthesis in radiosensitive tissues of irradiated rats.
Radiobiologia 14, 168 (1974)
- 76 GOSSE, C., J.B. LE PECQ, P. DEFRANCE, and C. PAOLETTI:
Initial degradation of deoxyribonucleic acid after injection in mammals.
Cancer Res. 25, 877 (1965)
- 77 HANKS, J.H. and R.E. WALLACE:
Relation of oxygen uptake and temperature in the preparation of tissues by refrigeration.
Proc. Soc. exp. Biol. Med. 71, 196 (1949)
- 78 HILTON, J. and SARTORELLI, A.C.:
Induction of microsomal drug-metabolizing enzymes in regenerating liver.
Adv. Enzyme Reg. 8, 153 (1970)
- 79 HÖRDER, M.H., W.D. STIER und D. BRUNSWIG:
Zur klinischen Anwendung von Heparin-Heparinoid-Gemischen.
Arzneimittelforschung 19, 1873 (1969)
- 80 HÖRDER, M.H., D. HEY und D. BRUNSWIG:
Nebenwirkungen nach Verabreichung eines Heparin-Heparinoid-Gemisches beim Menschen.
Arzneimittelforschung 19, 1876 (1969)

- 81 HOLLATZ, R. und TEMPEL, K.:
Induktionsvorgänge bei der Maus unter dem Einfluß von
Polyanionen.
Arch. int. Pharmacodyn. Ther. 210, 128 (1974)
- 82 HOLLEMAN, A.F. und E. WIBERG:
Lehrbuch der anorganischen Chemie.
Berlin: De Gruyter 1964
- 83 HOMEN, E.R., R.P. ZENDZIAN, L.D. SCHOTT,
H.B. LEVY, and R.H. ADAMSON:
Studies on polyI-C toxicity in experimental animals.
Toxicol. appl. Pharmacol. 23, 579 (1972)
- 84 HOPF, U., K.H. MEYER ZUM BÜSCHENFELDE,
U. GROTH und J. FREUDENBERG:
Zur Vitalitätsprüfung isolierter Rattenleberzellen.
Res. exp. Med. 163, 199 (1974)
- 85 HOWARD, R.B., A.K. CHRISTENSEN, F.A. GIBBS,
and L.A. PESCH:
The enzymatic preparation of isolated intact parenchymal
cells from rat liver.
J. Cell Biol. 35, 675 (1967)
- 86 HOWARD, R.B. and L.A. PESCH:
Respiratory activity of intact, isolated parenchymal cells
from rat liver.
J. biol. Chem. 243, 3105 (1968)
- 87 ITZE, L., S.D. VESSELINOVITSCH, and K.V.N. RAO:
Estimation of the rate of DNA-synthesis in newborn, regene-
rating and intact mice livers.
Physiol. bohemoslov. 22, 475 (1973)

- 88 IZARD-VERCHERE, C., P. RUMPF et C. VIEL:
Nr. 344 - Contribution à l'étude de la réaction de Dische
et de son mécanisme.
III. Influence de la structure carbonylée et conclusions.
Bull. Soc. Chim. (France) 7, 2134 (1971)
- 89 JAQUEMIN-SABLON, A., J. LAVAL, J.Y. LE TALAER,
J.B. LE PECQ et C. PAOLETTI:
Inhibition de la désoxyribonucléase acide par les acides
ribonucléiques.
C.R. Acad. Sci. 259, 2551 (1964)
- 90 JACQUES, P.J.:
Endocytosis, exoplasmic apparatus, and rudiments of
applied lysosomology.
p. 278 ff. in: LEDOUX, L. (ed.):
Uptake of informative molecules by living cells.
Amsterdam: North Holland 1972
- 91 JOHNSON, H.G. and JOHNSON, A.G.:
Regulation of the immune system by synthetic polynucleotides.
II. Action on peritoneal exudate cells.
J. exp. Med. 133, 649 (1971)
- 92 JULIANO, R. and E. MAYHEW:
Interaction of polynucleotides with cultured mammalian cells.
1. Uptake of RNA by Ehrlich ascites carcinoma cells.
Exp. Cell Res. 73, 3 (1972)
- 93 JULLIEN, P. and J. DE MAEYER-GUIGNARD:
Toxic effect of polyribonucleosinic-polyribocytidylic acid on
mouse hemopoietic stem cells.
Int. J. Cancer 7, 468 (1971)

- 94 KABOYASHI, J., Y. TAKEGAWA, and H. TAGASHIRA:
Restorative effect of an alkaline hydrolysis product of yeast RNA (nucleoton), adenine and d-AMP on the DNA content of liver cells in irradiated mice.
Tokushima J. exp. Med. 20, 29 (1973)
- 95 KAO, P.C., J.D. REGAN, and E. VOLKIN:
Fate of homologous and heterologous DNAs after incorporation into human skin fibroblasts.
Biochim. biophys. Acta 324, 1 (1973)
- 96 KARLSON, P.:
Kurzes Lehrbuch der Biochemie, p. 285 ff.
Stuttgart: Thieme 1972
- 97 KIEHL, B.L., P.B. STOTT, H.C. HUANG, and D.A. BUTHALA:
Anticoagulants as inhibitors of reverse transcriptase activity, J. natl. Cancer Inst. 51, 1705 (1973)
- 98 KISSMEYER-NIELSEN, F. and KJERBYE, K.E.:
Histocompatibility testing, p. 381
Kopenhagen: Munksgaard 1967
- 99 KNOX, W.E.:
Enzyme patterns in fetal, adult, and neoplastic rat tissues, p. 254 ff.
Basel: Karger 1972
- 100 GEM. KOMM. SCHWEIZ., DEUTSCH., ÖSTERR. GES. KLN. CHEM.:
Meßgrößen und Einheiten in der klinischen Chemie. Die internationalen Empfehlungen (IFCC, ISO, IUPAC).
Z. klin. Chem. klin. Biochem. 4, 180 (1974)

- 101 KRAEMER, R.J., COFFEY, D.S.:
The interaction of natural and synthetic polyanions with
mammalian cells.
II. Nuclear swelling.
Biochim. biophys. Acta 224, 568 (1970)

- 102 KRECHETOVA, G.D., I.A. CHUDINOVA, and V.S. SHAPOT:
On the properties of polyvinyl sulphate as ribo- and deoxy-
ribonuclease inhibitor.
Biochimija 28, 682 (1963)

- 103 KREIDER, J.W. and S.A. BENJAMIN:
Tumour immunity and the mechanism of polyinosinic-polycyti-
dylc acid inhibition of tumour growth.
J. natl. Cancer Inst. 49, 1303 (1972)

- 104 KUSCHINSKY, G. und H. LÜLLMANN:
Kurzes Lehrbuch der Pharmakologie, p. 76 ff.
Stuttgart: Thieme 1972

- 105 LASKOWSKI, M.:
Deoxyribonucleases
p. 139 ff. in: BOYER, P.D., H. LARDY, and
K. MYRBÄCK (eds.):
The enzymes.
New York: Academic 1961

- 106 LEDOUX, L., G.B. GERBER, P. CHARLES, J. REMY, and
J. REMY-DEFRAIGNE:
Uptake of labelled DNA by isolated perfused organs.
Experientia 23, 16 (1967)

- 107 LEDOUX, L., P. CHARLES, and M. SRÖGL:
Fate of exogenous DNA in blood and hyperplastic genital tract of female mice.
Nature 214, 1241 (1967)
- 108 LEDOUX, L. and CHARLES, P.:
Fate of exogenous DNA in mammals.
p. 397 ff. in: LEDOUX, L. (ed.):
Uptake of informative molecules by living cells.
Amsterdam: North Holland 1972
- 109 LEVY, H.B., L.W. LAW, and S.A. RABSON:
Inhibition of tumour growth by polyinosinic-polycytidylic acid.
Proc. natl. Acad. Sci. 62, 357 (1969)
- 110 LEVY, H.B., R. ASOVSKY, F. RILEY, A. GARAPIN,
H. CANTOR, and R. ADAMSON:
The mechanism of the antitumour action of polyI:polyC.
Ann. N.Y. acad. Sci. 173, 640 (1970)
- 111 LEVY, H.B. and F. RILEY:
The effect of polyinosinic-polycytidylic acid on tumour metabolism.
Proc. Soc. exp. Biol. Med. 135, 141 (1970)
- 112 LEVY, H.B.:
Interferon and interferon inducers in the treatment of neoplastic diseases.
Cancer Chemother. II 22, 53 (1972)
- 113 LEVY, S.W.:
Effects of heparin in vivo on lysosomal enzymes in rat plasma.
Can. J. Biochem. 45, 1145 (1967)

- 114 LEVY, S.W.:
Plasma esterase and acid ribonuclease following the injection of heparin in dogs.
Can. J. Biochem. 46, 229 (1968)
- 115 LINBINZON, R.E., S.A. ROGACHEVA, and G.G. RUSINOVA:
Prophylactic and therapeutic action of nucleic acids during acute radiation sickness.
Radiobiologia 7, 455 (1967)
- 116 LOECHLER WADELL, M.C.:
Alteration of protein synthesis in cartilage by a synthetic double-stranded polyribonucleotide.
J. dent. Res. 50, 1072 (1971)
- 117 MARQUARDT, H.:
Polyribonucleosinic-polyribocytidylic acid prevents chemically induced malignant transformation in vitro.
Nature 246, 228 (1973)
- 118 MARTIN, C.R.:
Thymus gland and heparin influences on renal electrolyte excretion in male hooded rats.
Gen. comp. Endocrin. 15, 339 (1970)
- 119 MATYASOVA, J., M. SKALKA, M. CEJKOVA, and G. BLAZICEK:
The effect of radiation on deoxyribonucleoproteins in animal tissues.
V. Action of various polyanions on deoxyribonucleoprotein of mouse spleen and thymus after irradiation.
Fol. biol. 17, 328 (1971)

- 120 MATYASOVA, J., M. SKALKA, and M. CEJKOVA:
The importance of molecular weight of inorganic polyphosphates for their interaction with deoxyribonucleoprotein of animal tissues.
Fol. biol. 20, 193 (1974)
- 121 MAYHEW, E. and R. JULIANO:
Interaction of polynucleotides with cultured mammalian cells.
II. Cell surface charge density and RNA uptake.
Exp. Cell Res. 77, 409 (1973)
- 122 MAYHEW, E.:
Interaction of polynucleotides with cultured mammalian cells.
III. Initial binding at cell surfaces.
Exp. Cell Res. 86, 87 (1974)
- 123 MEIZEL, S. and E.R.M. KEY:
Studies of the incorporation in vitro of deoxyribonucleic acid by cells of the Ehrlich-Lettré ascites carcinoma.
Biochim. biophys. Acta 103, 431 (1965)
- 124 MEJBAUM, W.:
Über die Bestimmung kleiner Pentosemengen insbesondere in Derivaten der Adenylsäure.
Z. physiol. Chem. 258, 117 (1939)
- 125 METZ, J., T. STAU und R. TAUGNER:
Über die Pharmakokinetik von Heparin und Heparinoiden.
Verh. deutsch. Ges. inn. Med. 78, 1570 (1972)
- 126 MICHELSEN, A.M., J. MASSOULIE, and W. GUSCHLBAUER:
Synthetic Polynucleotides.
Progr. Nucl. Acid Res. mol. Biol. 6, 83 (1967)

- 127 MORAHAN, P.S., A.E. MUNSON, W. REGELSON,
S.L. COMMERSFORD, and L.D. HAMILTON:
Antiviral activity and side effects of polyriboinosinic and
cytidylic acid complexes as effected by molecular size.
Proc. natl. Acad. Sci. 69, 842 (1972)

- 128 MOSKALEVA, E.Y. and V.K. MAZURIK:
Exogenous DNA and activity of aspartate carbamoyl trans-
ferase, DNA-polymerase and DNA-ases in hemopoetic or-
gans of irradiated rats.
Radiobiologia 14, 172 (1974)

- 129 MUNRO, H.N. and A. FLECK:
Recent developments in the measurement of nucleic acids
in biological materials.
J. Soc. analyt. Chem. 91, 1079 (1966)

- 130 MUSCHAWECK, R., H. FEIER und H. GRÖTSCH:
Antikoagulantien und Fibrinolytica.
p. 378 ff. in: EHRHARDT, G. und H. RUSCHIG (Hrsg.):
Arzneimittel, Band 2
Weinheim: Chemie 1972

- 131 NEUHOFF, V., W.B. SCHILL, and H. STERNBACH:
Micro-analysis of pure deoxyribonucleic acid-dependent
ribonucleic acid polymerase from Escherichia coli. Action
of heparin and rifampicin on structure and function.
Biochem. J. 117, 623 (1970)

- 132 NEUMÜLLER, O.A.:
Römpps Chemie-Lexikon
Stuttgart: Franckh 1972

- 133 NORMAN, N. and K. NORRBY:
Tumour cell volume changes in vivo induced by heparin.
Path. Eur. 6, 268 (1971)
- 134 NORRBY, K.:
Effect of heparin on cell population kinetics, mitosis and
topoinhibition.
Virchows Arch. Abt. B Zellpath. 9, 292 (1971)
- 135 NORRBY, K.:
Effect of heparin on cell proliferation and kinetics in
vitro. An outline of a drug-testing scheme.
p. 269 ff. in: GARATTINI, S. and G. FRANCHI (eds.):
Chemotherapy of cancer dissemination and metastasis.
New York: Raven 1973
- 136 ORMAI, S., A. HAGENBEEK, and D.W. VAN BEKKUM:
Lymphocyte-mobilizing agents: Effects of polymethacrylic
acid on transplantable lymphoma in rodents.
Eur. J. Cancer 6, 365 (1970)
- 137 PARISH, J.H.:
Principles and practice of experiments with nucleic acids,
p. 175 ff.
London: Longman 1972
- 138 PETROVIC, D.:
Restoration of radiation-induced damage by nucleic acids.
Corr. Top. Radiat. Res. 4, 251 (1968)
- 139 PETROVIC, J., G. JOVICKI, and N. CZERMELJ:
The fate of heterologous deoxyribonucleic acid injected into
the blood stream of chicken embryos.
Jugoslav. physiol. pharmacol. Acta 6, 49 (1970)

- 140 PETROVIC, D., A. FERLE-VIDOVIC, and B. NAGY:
Further evidence of the possible mechanisms involved in the
restorative effects of DNA in X-irradiated mammalian cells.
Stud. biophys. 43, 13 (1974)
- 141 PETTIJOHN, D.E.:
Transcription of a RNA polymerase-DNA complex from *E.coli*:
Evidence for in vitro synthesis of ribosomal RNA.
Biochem. biophys. Res. Comm. 35, 541 (1969)
- 142 POTEMSIL, M. and A. GOLDFEDER:
Inhibitory effect of polyinosinic-polycytidylic acid on the
growth of transplantable mouse mammary carcinoma.
Proc. Soc. exp. Biol. Med. 139, 1392 (1972)
- 143 RAAKE, W.:
Untersuchung über das anabol wirksame Prinzip im T-Vitamin.
Diss. med. vet. München 1970
- 144 REGELSON, W. and J.F. HOLLAND:
The anionic polyelectrolyte, polyethylene sulphonate, as a
new antiplastic agent.
Nature 181, 46 (1958)
- 145 REGELSON, W.:
The antimutagenic activity of polyanions.
Adv. Chemother. 3, 303 (1968)
- 146 DE REUCK, A.V.S. and M.P. CAMERON:
Lysosomes, p. 114
Boston: Little, Brown, and Comp. 1963

- 147 RINALDINI, L.M.J.:
The isolation of living cells from animal tissues.
Int. Rev. Cytol. 7, 587 (1958)
- 148 RINGSDORF, H.:
Makromolekulare Verbindungen als potentielle Strahlenschutz-
stoffe gegen ionisierende Strahlen.
Strahlenther. 132, 627 (1967)
- 149 ROBERTS, M.E., C. JONES, and M.A. GERVING:
Radioprotective action of RNA in mice.
Life Sci. 4, 1913 (1965)
- 150 RÖSSNER, W.:
Der Blut-Hirnschranken (BHS)-Test an der Maus.
Berl. Münch. Tierärztl. Wschr. 23, 461 (1968)
- 151 ROVENSKY, A.:
The influence of polyvinyl sulphate upon the growth and
mitotic activity of mouse and rat normal and malignant explants.
Wopr. onkol. 9, 18 (1963)
- 152 SASAKI, S.:
Production of lymphocytosis by polysaccharide polysulphates
(heparinoids).
Nature 214, 1041 (1967)
- 153 SCHEINTAUB, H.M. and R.J. FIEL:
Polyanion induced physical changes in isolated nuclei.
Arch. Biochem. Biophys. 158, 171 (1973)
- 154 SCHELL, P.L.:
Uptake of polynucleotides by intact mammalian cells (IV):
synthetic homoribopolynucleotides.
Z. Naturforsch. 23b, 1117 (1968)

- 155 SCHNEIDER, W.C.:
Phosphorous compounds in animal tissues. I. Extraction and estimation of deoxypentose nucleic acid and of pentose nucleic acid.
J. biol. Chem. 161, 293 (1945)
- 156 SEGLEN, P.O.:
Preparation of rat liver cells.
III. Enzymatic requirements for tissue dispersion.
Exp. Cell Res. 82, 391 (1973)
- 157 SHATKIN, A.J.:
Colorimetric reactions for DNA, RNA, and protein determinations.
Fund. Techn. Virol. 22, 231 (1969)
- 158 SIEBERT, G.:
Desoxyribonukleasen.
p. 1061 ff. in: LANG, K. und E. LEHNARTZ (Hrsg.):
Handbuch der physiologisch- und pathologisch-chemischen Analyse. IV, B, von Hoppe-Seyler/Thierfelder.
Berlin: Springer 1966
- 159 SIEBERT, G.:
Ribonukleasen
p. 721 l.c. 136
- 160 SINGH, C. and J. MISRA:
Behaviour differences between native DNA and denatured DNA.
Experientia 22, 599 (1966)

- 161 SKALKA, M. and J. MATYASOVA:
The increased sensitivity of deoxyribonucleoprotein complex
of irradiated tissues to the action of heparin.
Int. J. radiol. Biol. 11, 193 (1966)
- 162 SKALKA, M., J. MATYASOVA, and M. CEJKOVA:
Heparin-induced stimulation of in vitro incorporation of
labelled thymidine into thymocyte nuclei.
Fol. biol. 14, 466 (1968)
- 163 SKALKA, M. and M. CEJKOVA:
Enzymatic degradation of DNA and deoxyribonucleoprotein in
the presence of polyanions.
Fol. biol. 19, 68 (1973)
- 164 SLOTOVA, J. and Z. ZARPFEL:
Dependence of repair effect of exogenous DNA on time-inter-
val of its application to irradiated cells.
Stud. biophys. 44, 191 (1974)
- 165 SNOW, M.H.L. and H. MC LAREN:
The effect of exogenous DNA upon cleaving mouse embryos.
Exp. Cell Res. 86, 1 (1974)
- 166 STAU, T., J. METZ, and R. TAUGNER:
Exogenous ³⁵S-labelled heparin: Organ distribution and
metabolism.
Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol. 280, 93 (1973)
- 167 SVED, S.:
The metabolism of exogenous ribonucleic acids injected into
mice.
Can. J. Biochem. 43, 949 (1965)

- 168 SZYBALSKA, F.H. and W. SZYBALSKI:
Genetics of human cell lines.
IV. DNA-mediated heritable transformation of a biochemical trait.
Proc. natl. Acad. Sci. 48, 2026 (1962)
- 169 TEMPEL, K.:
Polyanionen als Desoxyribonukleasen-Inhibitoren am Beispiel von Polyvinylsulfat.
Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol. 257, 12 (1967)
- 170 TEMPEL, K.:
Phosphatasen der Maus unter dem Einfluß von Polyvinylsulfat.
Arzneimittelforschung 19, 1611 (1969)
- 171 TEMPEL, K.:
Zur Wirkung von Desoxyribonukleinsäure und Heparinoiden auf den Nukleinsäurestoffwechsel der Maus.
Z. Naturforsch. 24b, 1550 (1969)
- 172 TEMPEL, K.:
Zur Metachromasie von Toluidinblau in Gegenwart von Nukleinsäuren.
Z. Naturforsch. 24b, 1279 (1969)
- 173 TEMPEL, K.:
Desoxyribonukleinsäure und Desoxyribonukleasen von Maus und Hühnerembryo unter dem Einfluß von Polyvinylsulfat.
Klin. Wschr. 47, 165 (1969)

- 174 TEMPEL, K. und H. JÄHDE:
Regeneration von Mäusenieren nach Schädigung durch Folsäure unter dem Einfluß von Ganzkörperröntgenbestrahlung, 2,4,6-Triäthylenimino-s-triazin und Polyanionen.
Arzneimittelforschung 22, 2126 (1972)
- 175 TEMPEL, K. und M. WULFFIUS:
Desoxyribonuklease I in Mäusenieren nach Ganzkörper-Röntgenbestrahlung oder Gabe von 2,4,6-Triäthylenimino-s-triazin unter dem Einfluß von Polyanionen.
Experientia 29, 997 (1973)
- 176 TERESHCHENKO, O.Y. and E.P. GOLYSHEW:
Therapeutic effect of DNA on radiation destruction of cells of radiosensitive rat tissues.
Radiobiologia 13, 221 (1973)
- 177 TITTENSOR, J.R. and R.T. WALKER:
The isolation, analysis and chemical reactions of DNA-III.
Eur. Polymer J. 4, 39 (1968)
- 178 TUNIS, M. and W. REGELSON:
A comparative study of the inhibiting effects of anionic polyelectrolytes on deoxyribonucleases.
Arch. Biochem. Biophys. 101, 448 (1963)
- 179 VANDEPUTTE, M., S.K. DATTA, A. BILLIAU, and P. DE SOMER:
Inhibition of polyoma virus oncogenesis in rat by polyribonucleosinic-ribocytidylic acid.
Eur. J. Cancer 6, 323 (1970)

- 180 VANYUSHIN, B.F. and D.B. DUNN:
The dissociation of 80-S ribosomes with polyvinyl sulphate.
Biochim. biophys. Acta 134, 91 (1967)
- 181 WACKER, A., M. ISHIMOTO und P. CHANDRA:
Spezifische und unspezifische Hemmung der zellfreien
Proteinsynthese mit Polyanionen.
Z. Naturforsch. 22b, 413 (1967)
- 182 WACKER, A., P. CHANDRA, J. HAENZEL, and
D. GERICKE:
Effect of polyanions on the antibody formation by spleen
cells.
Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem. 351, 1273 (1970)
- 183 WACKER, A., E. LODEMANN, J. DIEDERICH,
K. MOHRBUTTER, and U. LAUSCHKE:
Induction of interferon in L-cells by polyinosinic-poly-
cytidylic acid in the presence of cationic compounds.
Arch. ges. Virusforsch. 36, 71 (1972)
- 184 WALTER, G., W. ZILLIG, P. PALM, and E. FUCHS:
Initiation of DNA-dependent RNA-synthesis and the effect
of heparin on RNA polymerase.
Eur. J. Biochem. 3, 194 (1967)
- 185 WATTERS, C. and P.M. GULLINO:
Translocation of DNA from vascular into the nuclear compart-
ment of solid mammary tumours.
Cancer Res. 31, 1231 (1971)

- 186 WOLF, F.:
Zur Wirkung von Polyvinylsulfat auf Desoxyribonukleinsäure und Desoxyribonukleasen.
Diss. med. vet. München 1967
- 187 ZAMENHOF, S., H. BURSZTYN, K. RICH, and P.J. ZAMENHOF:
The determination of DNA and cell number in brain.
J. Neurochem. 11, 505 (1964)
- 188 ZIMMERMANN, E. und D.D. SCHMIDT :
Vergleichende Untersuchung der thermischen Denaturierung von RNS und DNS.
Biochem. Z. 344, 375 (1966)

Herrn Prof. Dr. K. Tempel gilt für die Überlassung des Themas sowie für seinen wertvollen Rat und seine Anleitung mein besonderer Dank.

LEBENS LAUF

Fritz Rupert Ungemach	geb. am 6. Februar 1947 in München
Eltern	Friedrich Ungemach, städt. Amtsrat Lilly Ungemach, geb. Staubitzner
Volksschule	von 1953 - 1957 an der Dom-Pedro-Schule in München
Oberschule	von 1957 - 1967 am Oskar-von-Miller-Gymnasium in München 1967 Reifeprüfung in München
Hochschule	von 1967 - 1972 Studium der Veterinärmedizin an der Universität München 1973 Staatsexamen
Approbation	April 1973
Dissertation	seit Juli 1972 mit vorliegender Arbeit befaßt
verheiratet	seit 15. November 1971 mit der iranischen Staatsangehörigen und Apothekerin Golgehan Edaretshi

